

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Eliška Pácalová**

Vznik asymetrie pólů v rámci růstu oocytů *Xenopus laevis*

Formation of pole asymmetry during the *Xenopus laevis* oocytes growing

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Ing. Jiří Vávra

Praha, 2020

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část, nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 4.6. 2020

Eliška Pácalová

Podpis

## **Poděkování**

Touto cestou bych chtěla nesmírně poděkovat svému školiteli Mgr. Ing. Jiřímu Vávrovi za ohromnou ochotu, trpělivost a cenné rady při psaní této bakalářské práce. Nesmím ani zapomenout na poděkování nejbližšímu okolí jako rodině, přátelům a příteli za trpělivost a pochopení v čase stráveném nad touto prací.

## **Abstrakt**

Žába *Xenopus laevis* je významným modelovým organismem ve vývojové biologii, buněčné biologii a fyziologii. Oocyty tohoto obojživelníka jsou využívány například pro studium mechanismů oogeneze či studium membránových proteinů. Během oogeneze dochází k ustanovení animálně-vegetální osy s asymetrickým rozložením determinantních molekul ovlivňující správný vznik embrya a tělních os. Cílem této práce je poskytnout přehled transportních mechanismů vedoucích k tomuto asymetrickému rozložení molekul (především mRNA) a organel do animálního a vegetálního pólu a jejich regulaci.

**Klíčová slova:** *Xenopus laevis*, oocyt, animálně-vegetální osa, cytoskelet, mitochondriální oblak, METRO, časná dráha, pozdní dráha

## **Abstract**

A frog *Xenopus laevis* is an important model organism used in developmental and cell biology and physiology. Oocytes of this species are frequently used for study of mechanisms of oogenesis and membrane proteins. Through oogenesis an animal-vegetal axis is established by asymmetric distribution of determinant molecules which are important in embryogenesis and establishment for another body axes. The main aim of this thesis is to overview transport mechanisms for establishment of asymmetric molecule (especially mRNA) and organelles asymmetry to animal and vegetal poles and their regulation.

**Key words:** *Xenopus laevis*, oocyte, animal pole, vegetal pole, cytoskeleton, intracellular transport, mitochondrial cloud, METRO, early pathway, late pathway

## Seznam zkratek

<b>40LoVe</b>	40 kD localized vegetal protein	40 kD dlouhý vegetálně lokalizační protein
<b>AGO/xLAGO</b>	Argonaut/ <i>Xenopus laevis</i> Argonaut	Argonaut/Argonaut 2
<b>A-V</b>	Animal-vegetal	Animálně-vegetální
<b>BMP</b>	Bone Morphogenetic protein	Kostní morfogenetické protein
<b>cAMP</b>	Cyclic adenosin monophosphate	Cyklický adenosinmonofosfát
<b>CNS</b>	Central nervous system	Ventrální nervová soustava
<b>CPE</b>	Cytoplasmatic polyadenylation element	Cytoplazmatický polyadenylační element/sekvence
<b>CPEB</b>	CPE binding protein	CPE vazebný protein
<b>CR1</b>	Complement receptor type 1	Receptor pro komplement typu 1
<b>CUG-BP1</b>	CUG binding protein 1	Vazebný protein 1 pro motiv CUG
<b>Dnd1</b>	Dead-end1	Dead-end1
<b>Dnmt1</b>	DNA-methyltransferase 1	DNA-methyltransferáza 1
<b>eIF3</b>	Eukaryotic initiation factor 3	Eukaryotický iniciační faktor 3
<b>elf4</b>	Eukaryotic initiation factor 4	Eukaryotický iniciační faktor 4
<b>Fatvg</b>	Adipose related vegetal localised	Na tukové tkáni závislý vegetálně lokalizovaný protein
<b>FXR1</b>	Fragile-X-mental-retardation related protein 1	Protein 1 související se syndromem fragilního chromozomu X
<b>Gdf1</b>	Growth differentiation factor 1	Růstový diferenciační faktor 1
<b>GVBD</b>	Germinal vesicle breakdown	Rozpad zárodečného váčku
<b>hnRNP</b>	Heterogenous ribonucleoprotein particle	Heterogenní ribonukleoproteinový komplex
<b>IRES</b>	Internal ribosome entry site	Vnitřní sekvence pro vstup ribozomu
<b>LE</b>	Localization element	Lokalizační element
<b>lncRNA</b>	Long-noncoding RNA	Dlouhé nekódující RNA
<b>MBE</b>	Musashi binding element	Musashi vazebný element
<b>METRO</b>	Message transport organizer	Organizátor přenosu mRNA
<b>miRNA/microRNA</b>	Micro ribonucleotic acid	Malá ribonukleová kyselina
<b>MO</b>	Mitochondrial cloud	Mitochondriální oblak
<b>mRNA</b>	Messenger ribonucleic acid	Mediátorová/informační RNA
<b>MTOC</b>	Microtubule organizing center	Centrum organizující mikrotubuly
<b>Myt1</b>	Membrane associated tyrosine and threonine specific inhibitory kinase	Tyrosin/Threonin membránová inhibitorová kináza
<b>PBE</b>	Pumilio binding element	Pumilio vazebný element
<b>PHAX</b>	Phosphorylated adapter RNA export protein	Fosforylovaný adaptér pro export RNA
<b>Prpp</b>	Proline-rich protein	Na prolin bohatý protein
<b>PTB</b>	Polypyrimidine tract-binding protein	Polypyrimidin vazebný protein
<b>Rbm24b</b>	RNA-binding protein 24B	RNA vazebný protein 24B
<b>Rbm42b</b>	RNA-binding protein 42B	RNA vazebný protein 42B
<b>RBP</b>	RNA-binding proteins	RNA vazebné proteiny
<b>RISC</b>	RNA-induced silencing complex	Komplex umlčující aktivitu RNA
<b>RNA</b>	Ribonucleic acid	Ribonukleová kyselina
<b>RNP</b>	Ribonucleoprotein particle	Ribonukleoproteinový komplex
<b>TCE</b>	Translation control element	Translační kontrolní element

	lement	
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming grown factor $\beta$	Transformační růstový faktor $\beta$
<b>Trim36</b>	Tripartite motif-containing protein 36	Protein 36 obsahující tripartitní motiv
<b>UTR</b>	Untraslated region	Nepřekládaná oblast
<b>VegT</b>	Vegetal T-box transcription factor	Vegetální transkripční faktor T-box rodiny
<b>Vg1</b>	Vegetally localised protein 1	Vegetálně lokalizovaný protein 1
<b>Vg1RBP</b>	<i>Vg1</i> RNA-binding protein	Vazebný protein pro mRNA <i>Vg1</i>
<b>Wnt signalizace</b>	Wingless/Int-1 signalization	Wingless/Int-1 signalizace
<b>Wnt11</b>	Wingless-type member 11	Člen 11 rodiny „wingless“
<b>XDazl</b>	<i>Xenopus</i> deleted in azoospermia-like protein	Gen způsobující svou nepřítomností azoospermii u drápatky
<b>Xlan4</b>	<i>Xenopus</i> leptine antagonist	Antagonista leptinu u drápatky
<b>XLerk</b>	<i>Xenopus</i> ligand for Eph receptor tyrosine kinases	Ligand pro Eph receptor tyrozinové kinázy u drápatky
<b>Xlsirt</b>	<i>Xenopus laevis</i> short interspersed repeats transcripts	Transkripty <i>Xenopus laevis</i> s krátkými tandemovými repeticemi
<b>XNOA36</b>	<i>Xenopus</i> nucleolar autoantigen 36	Jaderný autoantigen u drápatky
<b>Xpat</b>	<i>Xenopus</i> primordial germ cell associated transcript	Transkript asociovaný s primordiálními zárodečnými buňkami u <i>Xenopus</i>
<b>XPum</b>	<i>Xenopus</i> Pumilio	Pumilio protein u drápatky
<b>Xvelo</b>	<i>Xenopus</i> vegetally localised protein	Vegetálně lokalizovaný protein u drápatky

# Obsah

1	Úvod .....	1
2	Oocyty <i>Xenopus laevis</i> .....	2
2.1	Stádia oogeneze .....	3
2.2	Struktura oocytů .....	4
2.2.1	Mitochondriální oblak a germinální granula .....	6
3	Transportní dráhy v průběhu oogeneze .....	7
3.1	Animální polokoule .....	8
3.2	Vegetální polokoule .....	8
3.2.1	Časná (METRO) transportní dráha .....	10
3.2.2	Pozdní (Vg1) transportní dráha .....	11
3.2.3	Střední transportní dráha .....	13
4	Asymetrické rozdělení informačních molekul .....	13
4.1	Rozdělení mRNA a proteinů .....	14
4.2	Molekulární podstata transportu mRNA .....	16
5	Regulační mechanismy ovlivňující osud mRNA .....	20
5.1	Regulace pomocí miRNA a nekódujících RNA .....	21
5.2	Regulace translace závislá na CPE, MBE a PBE .....	22
5.3	Další mechanismy regulace a degradace .....	24
6	Závěr .....	26
7	Literatura .....	27

## 1 Úvod

*Xenopus laevis*, neboli drápatka vodní, je obojživelník spadající do čeledi *Pipidae*, hojně využívaný jako modelový organismus. Její genom je allotetraploidní složený ze dvou odlišných subgenomů S a L (Session *et al.*, 2016). I další zástupce stejné čeledi *Pipidae*, *Xenopus tropicalis* (drápatka tropická) neboli také *Silurana tropicalis*, je v dnešní době čím dál tím více využívaným modelovým organismem. Genom žáby *Xenopus tropicalis* je ovšem diploidní, na rozdíl od tetraploidní *Xenopus laevis*. Drápatka vodní a to její dospělci, oocyty i embrya, jsou v laboratořích využívány již od počátku 20. století a za tu dobu došlo na těchto obojživelnících k mnohým průlomovým objevům od objevu mnoha genů potřebných pro vývoj embryí, objevu organizátoru dorzálního rtu blastosporu (nebo také Spemannova organizátoru) až po objasnění základních signalizačních kaskád nejen embryologie jako je BMP signální dráha a Wnt signalizační kaskáda a s tím spojený objev  $\beta$ -kateninu (Blum and Ott 2018).

Pro oocyty drápatky vodní je typické rozlišení pólů oocytů na pól animální a vegetální již v průběhu oogeneze. Jedná se především o rozdílné složení jednotlivých pólů z hlediska molekul a struktur oocyty. Tuto asymetrii můžeme pozorovat i pouhým okem. Tmavý animální pól obsahuje pigmentová granula (melanosomy) zatímco ve světlém vegetálním pólu je skladován žloutek (ve formě žloutkových granul) a žloutkové proteiny (Danilchik and Gerhart, 1987). Obecně lze říci, že ektoderm zahrnující hlavně kůži a nervový systém vzniká v embryogenezi z buněk animálního pólu a vegetální pól dává vznik endodermu (Dale and Slack, 1987) a primordiálním zárodečným buňkám. Ke vzniku mesodermu dochází díky kombinaci interakcí mezi gradienty molekul vegetálního a animálního pólu, signály z těchto pólů i pro mesoderm specifickými faktory (Nieuwkoop, 1969).

Dalšími osami tvořící se po oplození a během embryogeneze jsou asymetrická dorzo-ventrální osa, anterior-posteriorní osa a pravo-levá osa. Dorzo-ventrální osa vzniká po průniku spermie do animální polokoule oocyty a to po události zvané kortikální rotace, kdy dojde pomocí mikrotubulů k posunu kortexu o cca 30° vzhledem k cytoplazmě (Vincent and Gerhart, 1987; Elinson and Rowning, 1988) a tím důležitému posunu dorzálních faktorů (molekul podstatných pro tvorbu dorzální strany embrya po oplození). Osa pravo-levá vzniká při prvním rýhování, kdy z původní buňky oocyty vznikají buňky 2 a je při dalším rýhování charakteristická

především asymetrickým rozložením některých ATPázových pump v jednotlivých buňkách, které tak ovlivňují a odlišují pravou a levou část embrya (Levin *et al.*, 2002).

Cílem této práce je především popsat základní struktury a molekulární mechanismy vzniku animálně-vegetální osy z pohledu jednotlivých organel a molekul (a to především mRNA) z hlediska oogeneze a to včetně pohledu na regulaci rozmístění molekul podle této osy až do brzké embryogeneze.

## 2 Oocyty *Xenopus laevis*

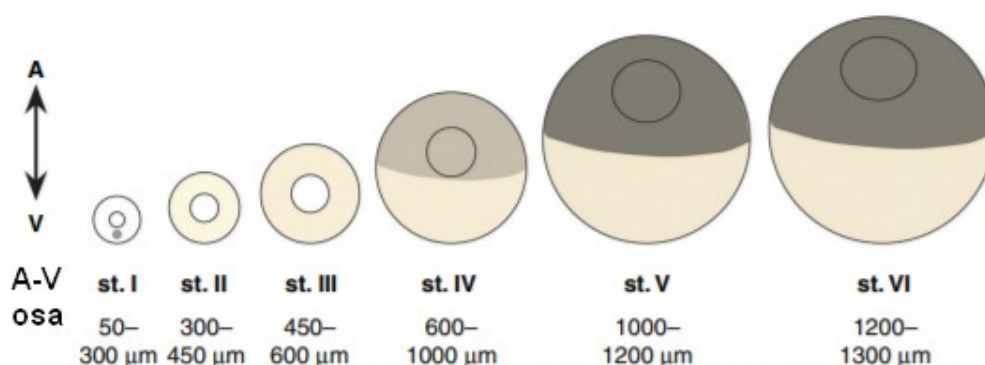
Oocyty žáby *Xenopus laevis*, jakožto jednoho z modelových organismů, jsou v dnešní době hojně využívány v mnoha odvětvích. Jelikož jsou tyto oocyty snadné ke kultivaci, poměrně velké (>1,2 mm) a dobře prostudované, lze je využít k mnohým embryologickým a molekulárně-genetickým výzkumům (Sun *et al.*, 2014). Především k výzkumu metabolických drah, cytoskeletu, struktury a funkčnosti proteinů i jiných živočišných druhů pomocí mikroinjekcí mRNA do oocyty a jejich následné exprese aparátem oocyty (Field *et al.*, 2017; Agüero *et al.*, 2018; Marchant, 2018).

Po dokončení sekvenace celého genomu *X. laevis* bylo nalezeno mnoho ortologních genů k lidským genům zapříčiňujících u člověka mnohá onemocnění (Blum and Ott 2018). Poměrně nově se využívají oocyty *Xenopus laevis* i ke studiu vlastností nádorových buněk a onkogeneze. Jejich podobnost spočívá především v obdobných transkripčních faktorech a shodných základních signálních drahách jako BMP signalizaci, Wnt kaskádě či Notch signalizaci (Hardwick and Philpott 2015). Dále jsou využívány pro výzkum účinku některých léků (Cheikh *et al.*, 2019) nebo při studiu nejruznějších poruch CNS u člověka (Zeng *et al.*, 2020) například díky možnosti studovat proteiny v jejich nativní i amyloidní konformaci, která je u člověka podkladem pro vznik Huntingtonovi a Alzheimerovi choroby (Hayes and Weeks, 2016). Mohou také sloužit k porozumění a srovnání oogeneze a embryogeneze jiných skupin živočichů, jelikož u mnoha druhů nalezneme homologické informační molekuly a proteiny k molekulám drápatky (Pocherniaieva *et al.*, 2018). Příkladem těchto druhů mohou být například *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio* (Krishnakumar *et al.*, 2018), někteří jeseteři (Pocherniaieva *et al.*, 2018) i člověk (De Domenico *et al.*, 2015; Blum and Ott, 2018).



## 2.1 Stádia oogeneze

Oogenezi *X. laevis* až do okamžiku oplození můžeme rozdělit na celkem 6 stádií s rozdílným složením informačních molekul a proteinů, odlišnou pigmentací a velikostí. Toto základní třídění bylo zavedeno již v roce 1972 (Dumont, 1972) a do nynější doby se stále používá (viz Obr.1).



**Obr 1: Stádia oogeneze *Xenopus laevis* podle Dumonta;** rozdělení jednotlivých stádií s odpovídajícím schématem a příslušnou velikostí v μm; ve stádiu I-III je bílou kruhovitou strukturou značen zárodečný váček, v dalších stádiích je značeno kruhovitou strukturou barvy příslušného animálního pólu; ve stádiu I šedě značen mitochondriální oblak; ve stádiích IV-VI rozdělení pólů na tmavý animální a světlý vegetální pól; Převzato a upraveno podle (Mowry, 2020).

Stádium I je charakteristické svou průhlednou cytoplazmou, velkým germinálním/zárodečným váčkem dosahujícím skoro celé výplně oocyty a počínajícím vznikem tzv. mitochondriálního oblaku. Pojmem zárodečný váček se označuje jádro nematurovaného oocyty. Pro stádium II je naopak charakteristická bílá barva celého oocyty a formování vitelinní membrány. V premelanosomech se již v tomto stádiu nachází nízká koncentrace melaninu, který začíná viditelně zbarvovat oocyt až ve stádiu III, kdy se zprvu stejně zabarví oocyt celý (až na místo přiléhající ke stěně vaječníku, kde je pigmentace větší) (Dumont, 1972). Začíná tedy postupná pigmentace animálního pólu a tvorba a přesun žloutku a žlutkových proteinů do pólu vegetálního (Danilchik and Gerhart, 1987).

K již pouhým okem viditelné diferenciaci na animální a vegetální pól dochází ve stádiu IV, kdy se jako animální pól označuje tmavá polokoule. V dalším stádiu V se jádro začíná lehce vychylovat ze středu oocyty do animální polokoule a premelanosomy maturují v melanosomy. Jako stádium VI se označuje stádium, kdy jsou oocyty již zcela připraveny k maturaci a oplození a dosahují velikosti až 1200-1300 μm. Pro toto poslední stádium je také typický tzv.

ekvatoriální pás, který je nepigmentovaný. Nachází se mezi animálním a vegetálním pólem a může měřit až 0,2 mm (Dumont, 1972).

Nematurované oocyty ve stádiu VI jsou zastaveny v profázi prvního meiotického dělení a mohou tak setrvat až několik let do doby, než dojde k jejich maturaci iniciované steroidním hormonem progesteronem produkovaným okolními folikulárními buňkami. Při této maturaci oocyty dokončí meiozu I, dojde k vypuzení prvního pólového tělíska a k tzv. rozpadu zárodečného váčku (GVBD, germinal vesicle breakdown). Posléze jsou oocyty opět zastaveny, tentokrát v metafázi druhého meiotického dělení. K dokončení druhého meiotického dělení dochází až po oplození spermií (Sato and Tokmakov, 2020).

## 2.2 Struktura oocytů

Oocyty obsahují obdobné základní organely jako somatické buňky, ale zároveň i některé pro ně typické jako žloutkové váčky, mitochondriální oblak a zárodečná granula (Dumont, 1972; Bement *et al.*, 2003). Dochází i k asymetrickému rozložení některých organel: jádro se v průběhu oogeneze přesouvá do animálního pólu, naopak mitochondrie, endoplazmatické retikulum a Golgiho komplex se částečně stanou součástí mitochondriálního oblaku ve vegetální polokouli oocytu (Dumont, 1972; Chang *et al.*, 2004; Sindelka *et al.*, 2008).

Endoplazmatické retikulum je zprvu rovnoměrně rozprostřeno kolem jádra navázané na animální i vegetální část jaderné membrány. Během oogeneze se endoplazmatické retikulum na animální straně jádra nemění, zatímco endoplazmatické retikulum asociované s mitochondriálním oblakem je časnou drahou přesouváno k vegetálnímu kortexu (Terasaki *et al.*, 2001). Mitochondrie oocytu se nenachází pouze v mitochondriálním oblaku, ale i v jiných částech oocytu, které jsou s oblakem spojeny, například v perinukleárním prostoru, kde tvoří tzv. perinukleární agregáty či ve zbytku cytoplazmy (Heasman *et al.*, 1984). Důležitou částí oocytu je i tzv. kortex nacházející se po celém povrchu oocytu. Jako kortex je označována většinou periférie oocytu: cytoplazmatická membrána a v ní končící konce cytoskeletu jakožto podporující struktury pod membránou. Na kortex přiléhá subkortikální matrix složený z molekul a struktur (mitochondrií, pigmentových a žloutkových granul), které jsou v ní zakotveny (Ryabova *et al.*, 1986). Transport a zachycování molekul do kortexu probíhá transportními drahami přiblíženými v kapitole 3.

Nedílnou součástí všech buněk včetně oocytu je propracovaná síť cytoskeletu podporující tvar buněk i přesun a pohyb organel a molekul. V oocytech již ve stádiu nula nalezneme především

tři typy cytoskeletu a s nimi asociované proteiny: mikrotubuly, aktinová vlákna a intermediální filamenta cytokeratinového typu (Gard *et al.*, 1997). Všechny tyto části jsou dynamicky reorganizovány a přestavovány v průběhu oogeneze, hrají velmi důležitou roli v samotném vzniku A-V asymetrie jako přepravní dráhy a vzájemně se ovlivňují (Palecek *et al.*, 1985; Bement and Capco, 1990; Alarcón and Elinson, 2001). Ovlivňují se především tak, že struktura mikrotubulární a cytokeratinové sítě je závislá na fibrilárním-aktinu, ale všechny struktury jsou nezávislé na cytokeratinové síti a jsou schopny udržet stejnou strukturu i bez přítomnosti této cytokeratinové sítě. K těmto výsledkům se dospělo pomocí experimentů s oocyty ve stádiu VI, které byly inkubovány s inhibitory proti jednotlivým typem cytoskeletu (Gard *et al.*, 1997).

Mikrotubuly tvoří nejprve poměrně denzní síť, postupně expandují do zbytku oocyty a ve stádiu III začínají interagovat s vegetálním kortexem. Původně se myslelo, že mikrotubuly mohou končit v kortexu jen svými minus konci, ale byla objevena subpopulace mikrotubulů končící i svými plus konci ve vegetálním kortexu. V animální polokouli žádná taková subpopulace dosud nebyla nalezena (Messitt *et al.*, 2008; Gagnon *et al.*, 2013). V průběhu oogeneze se mění množství a složení různě orientovaných mikrotubulů končících ve vegetálním kortexu. Po oplození dochází k postupné depolymerizaci tubulinu a následnému opětovnému nárůstu počtu mikrotubulů, které jsou důležité pro pozdější kortikální rotaci (Olson *et al.*, 2015). V oocytech nalezneme i  $\epsilon$ -tubulin, který je nerovnoměrně rozprostřen a akumulován v animálním pólu, protože je potřebný pro tvorbu centrozomu a budoucí rozchod chromozomů (Chang *et al.*, 2003). Aktinová vlákna se nachází v oocytech v četném zastoupení jak v jádře, tak i cytoplazmě. Již od brzkých stádií oocytů se nalézají kolem jádra a mitochondriálního oblaku a následně prochází podstatnou reorganizací. Směřují od jádra k vegetálnímu kortexu, v animální polokouli se nachází v menším množství (Yamagishi and Abe, 2015). Hlavní předpokládanou funkcí aktinových filament obklopujících a vázajících se na jádro je především role v posunu jádra do animálního pólu. Mimo to se nachází i samostatná aktinová filamenta volně v cytoplazmě (Roeder and Gard, 1994). Cytokeratinový cytoskelet udržuje strukturu a umístění mitochondriálního oblaku a germinálních granul (Franz *et al.*, 1983; Gard *et al.*, 1997) spolu s aktinovými vlákny (Gard, 1999). Po celou dobu oogeneze je tato síť spojena s jadernou membránou a vyztužuje i jadernou membránu. Cytokeratin se nachází v obou polokoulích, i když se zdá, že ve vegetální je cytokeratinová síť poněkud méně

organizovanější než v animální polokouli, kde se váže a podporuje strukturu jádra (Klymkowsky *et al.*, 1987; Gard *et al.*, 1997).

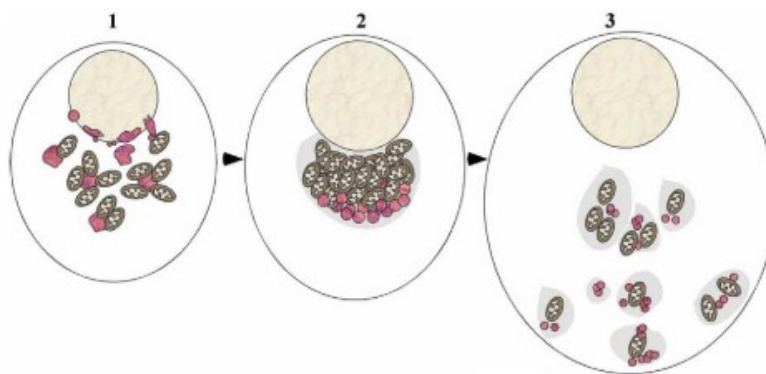
Mimo to se v jádře nachází více typů laminů, které podpírají strukturu jádra a na vnitřní straně jaderné membrány tvoří tzv. jadernou laminu. Po delecí těchto laminů se jádrojevilo mnohonásobně menší a nebylo zcela funkční. Mohl sice probíhat jaderný transport, ale nedošlo k replikaci DNA (Goldberg *et al.*, 1995).

### 2.2.1 Mitochondriální oblak a germinální granula

V oocytech se nachází i struktury pro oocyty typické, nenacházející se v jiných typech buněk, jako jsou mitochondriální oblak (zvaný také Balbianiho tělísko) a germinální/zárodečná granula.

Mitochondriální oblak (dále také jako MO) je bezmembránová struktura vyskytující se v brzkých stádiích oogeneze nacházející se ve vegetální polokouli oocyty. V této struktuře se ve stádiu I postupně začínají akumulovat především mitochondrie, které jsou zprvu rovnoměrně rozprostřené v cytoplazmě. Před stádiem I dochází k tvorbě menších shluků mitochondrií poblíž celého jádra, následně se začínají shlukovat na vegetální straně jádra a zůstávají stále spojeny s jadernou membránou. Poté se odpojí, nachází se volně v cytoplazmě a tvoří mitochondriální oblak. Nejvegetálnější část oblaku, která se postupně ve stádiu I formuje, se nazývá METRO (message transport organizer) a je velmi důležitá pro transport mRNA časnou transportní dráhou (viz Kapitola 3.2.1) (Kloc and Etkin, 1995; Wilk *et al.*, 2005). Některé molekuly mRNA se na vznikající oblak mohou vázat ještě před vznikem samotné struktury (Kloc *et al.*, 1996).

Nejprve oblak obsahuje jen mitochondrie a vysoce denzní granulofibrilární materiál (Heasman *et al.*, 1984), postupně i Golgiho komplex, lipidy, pigmentová granula, germinální granula, zachycené mRNA a endoplazmatické retikulum (Chang *et al.*, 2004). Endoplazmatické retikulum mitochondriálního oblaku hraje důležitou roli při zachycení mRNA v této struktuře do doby, než budou pomocí časně transportní dráhy METRO (viz kapitola 3.2.1) transportovány dále do vegetálního pólu a vegetálního kortexu (Chang *et al.*, 2004). Mitochondriální oblak jako struktura existuje jen ve stádiu zrání oocyty I, ve stádiu II se rozpadá na větší „ostrůvky“. Ve stádiu III se tyto ostrůvky specificky přesunou a vytvoří jakousi subkortikální strukturu u vegetálního kortexu oocyty (Heasman *et al.*, 1984). Formování a rozpad mitochondriálního oblaku je znázorněno na Obr.2.



**Obr. 2: Formování a rozpad mitochondriálního oblaku v průběhu oogeneze;** (1) Ve stádiu 0 dochází teprve k formování MO přiloženého k jádru; Stádium II je typické již jasnou strukturou MO složenou především z mitochondrií a zárodečných granul a tzv. METRO oblasti bohaté na molekuly mRNA (zobrazeny červeně); V pozdějších stádiích oogeneze (3) dochází k rozpadu MO na menší ostrůvky a jejich postupnému posunu k vegetálnímu kortexu; Převzato z (Kloc *et al.*, 2004).

Součástí mitochondriálního oblaku jsou také tzv. germinální, čili zárodečná granula, ze kterých později vzniká zárodečná plazma a z ní po oplození a rýhování primordiální zárodečné buňky, neboli buňky pohlavní (Tada *et al.*, 2012). Tato granula jsou spolu se žloutkovými váčky v cytoplazmě a později v kortexu zakotvena jemnou cytokeratinovou sítí (Kloc *et al.*, 2007). Struktura těchto granul je podepřena a kotvena na svém místě aktinovými vlákny kotvenými k jejich povrchu (Bement *et al.*, 2003). V těchto strukturách nalezneme mRNA sloužící později především jako determinanty zárodečné plazmy (Sindelka *et al.*, 2010, 2018), buňky endodermu (Dale and Slack, 1987) a proteiny a enzymy účastnící se metabolismu lipidů (Sindelka *et al.*, 2018).

Hlavním významem mitochondriálního oblaku je zřejmě akumulovat mRNA, kterou je později potřeba transportovat na vegetální pól. Naopak germinální granula svůj obsah (RNA a specifické proteiny) pravděpodobně chrání a jako proteosynteticky neaktivní skladují do doby, než budou v embryonálním vývoji potřebné (Kloc *et al.*, 2002).

Obdobu mitochondriálního oblaku nalezneme i u jiných živočichů, například u octomilky (*Drosophila melanogaster*), myši (*Mus musculus*) (Pepling *et al.*, 2007) nebo oocytů jeseterů (*Acipenser* sp.) jako tzv. Balbianiho tělíska (Zelazowska *et al.*, 2007).

### 3 Transportní dráhy v průběhu oogeneze

Transport vedoucí k asymetricky rozděleným molekulám je nedílnou součástí velkého množství germinálních i somatických buněk. V asymetrickém rozložení molekul nejen v oocytech jsou klíčové zejména molekuly mRNA (kódující následně exprimované proteiny).

Obecně k transportu dochází několika mechanismy a to především pomocí cytoskeletu či volnou difuzí a následným zachycením ve specifické struktuře (Castillon *et al.*, 2003). Tyto dva modely fungují i při oogenezi oocytů drápatky. Je možné, že původně v evoluci existovala jen jedna transportní dráha, a to pozdní transportní dráha (Zhou and King, 1996a). Tuto domněnku podporuje i fakt, že se transkripty časně i pozdní dráhy díky podobným až shodným lokalizačním elementům v *in vitro* experimentech mohou transportovat opačnou dráhou (Choo *et al.*, 2005).

### 3.1 Animální polokoule

Bohužel stále není přesně znám mechanismus segregace molekul do animální cytoplazmy. Předpokládá se, že k němu dochází až v pozdějších stádiích oogeneze difuzí z jádra lokalizovaném v animální polokouli a to nezávisle na aktivním transportu pomocí cytoskeletu (Grant *et al.*, 2014; Sindelka *et al.*, 2018). Patrně k transportu a zachytávání molekul do kortexu v animální polokouli nedochází (Zhang and King, 1996; Sindelka *et al.*, 2018).

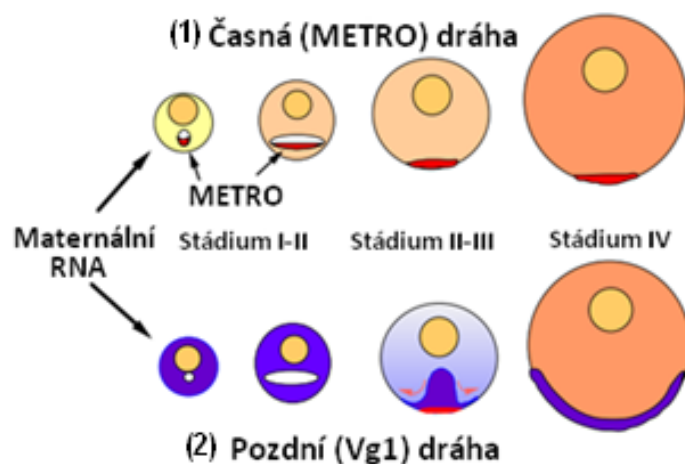
Některé mRNA, které jsou situovány v animální polokouli během oogeneze, mohou být po oplození oocyty ještě před svou translací přesunuty do vegetální polokoule (Grant *et al.*, 2014). Ukazuje se však, že tyto mechanismy mohou být spřaženy s faktory podílejícími se na dráhách vedoucích do vegetálního kortexu (Snedden *et al.*, 2013). Ovšem k této relokalizaci může docházet po oplození i z polokoule vegetální do animální jako bylo potvrzeno u genů transkripčních faktorů *Mix1* a *VegT*. Způsob těchto relokalizací po oplodnění není ještě zcela vyřešen, předpokládá se, že se tak děje kortikální rotací (Sudou *et al.*, 2016). Mnoho mRNA animální polokoule není dodnes známo a u některých stále není známá funkce či význam (Grant *et al.*, 2014). Mezi mRNA nabohacenými v animální polokouli patří *An1*, *An2*, *An3*, *Xlan 4* (Elinson *et al.*, 1993; Snedden *et al.*, 2013), *PHAX* (Snedden *et al.*, 2013) či také mRNA pro RNA polymerázu II,  $\alpha$ -aktin,  $\beta$ -tubulin či mitochondriální cytochrom C (Sindelka *et al.*, 2010). *Foxi1e* byl také objeven u oplozeného vajíčka nabohacen v animální polokouli. Po jeho translaci se jedná o transkripční faktor, který je ve správný čas sám aktivován pomocí *Foxi2* mRNA a který indukuje vznik ektodermu (Cha *et al.*, 2012).

### 3.2 Vegetální polokoule

V oogenezi probíhají dvě základní dráhy lokalizace mRNA do vegetální polokoule a vegetálního kortexu: časná dráha (jinak také METRO dráha) a pozdní dráha (Vg1 dráha) (Kloc and Etkin, 1995; Zhou and King, 1996a). Obě dráhy i s výsledným rozložením mRNA ve vegetálním

kortexu jsou znázorněny na Obr. 3. Některé mRNA mohou využívat ke svému transportu částečně obě tyto známé dráhy. Tento typ transportu je nazýván jako střední transportní dráha (Chan *et al.*, 1999; Betley *et al.*, 2002).

Tyto dráhy jsou odlišné nejen časem, ve kterém probíhají a odlišnými mechanismy, ale i způsobem, jakým molekuly mRNA zůstávají po oplození asociované s kortexem. Ve svých studiích se Forristall *et al.* zabývali tímto problémem na molekulách mRNA typických pro jednotlivé dráhy: *Xcat-2* (*nanos1*) pro časnou dráhu a *Vg1* pro dráhu pozdní. I ve stádiu 4-buněčného zárodku *Xcat-2* zůstával asociován s kortexem a nacházel se jen v 1, maximálně 2 blastomerách. Zatímco *Vg1* (někdy uváděn i jako *gdf1*) byl po oplození uvolněn z kortexu a v 4-buněčném stádiu byl rovnoměrně rozprostřen ve všech 4 blastomerách. Molekuly mRNA transportované časnou drahou jsou tedy déle vázány na kortex než molekuly transportované drahou pozdní. I další molekuly mRNA časně či pozdní dráhy mají podobný vzor rozložení po oplození jako tyto dvě zkoumané (Forristall *et al.*, 1995).



**Obr. 3: Časná (METRO) a pozdní (Vg1) transportní dráha a rozložení mRNA jednotlivých drah v kortexu;** žlutě znázorněn zárodečný váček (jádro); (1) Znázornění časně (METRO) dráhy, bílo-červeně znázorněn mitochondriální oblak, který se v průběhu oogeneze přesouvá do vegetálního kortexu, červeně oblast, kde se nachází mRNA časně dráhy v MO i později v kortexu, kde zaujímají strukturu tzv. vegetálního disku; (2) Znázornění pozdní (Vg1) dráhy, bíle znázorněn mitochondriální oblak, kde se ve stádiu I-II nehromadí mRNA transportované pozdní drahou, modře znázorněna oblast srozmístěním mRNA pozdní dráhy v brzkých stádiích oogeneze i po ukotvení v kortexu; Převzato a přeloženo podle (Kloc and Etkin, 1995).

Alespoň v některých bodech těchto drah je využíváno několika složek cytoskeletu, avšak s rozdílnou funkcí. Transport využívá pouze mikrotubuly (Yisraeli *et al.*, 1990), ale na

zachycování mRNA v kortexu se podílí cytokeratinová síť společně s aktinovými vlákny (Yisraeli *et al.*, 1990; Kloc and Etkin, 1995; Kloc *et al.*, 2007).

Uvnitř vegetální polokoule nebo také asociovány s zárodečnými granuly se také nachází tzv. determinanty zárodečné plazmy (Sindelka *et al.*, 2010) a složky důležitých signálních kaskád potřebných pro správný vývoj embrya a vznik tělních os jako například Wnt signalizační kaskády a její významný maternální transkript *Wnt11* potřebný pro dorzalizaci embrya (Tao *et al.*, 2005; Sindelka *et al.*, 2010). Xcat-2 (nanos1) protein zůstává asociován s germinálními buňkami a slouží jako represor translace určitých mRNA a to i u jiných živočišných druhů (Lai *et al.*, 2011).

### 3.2.1 Časná (METRO) transportní dráha

Časná transportní dráha, přezdívana také METRO dráha díky specifické oblasti mitochondriálního oblaku, obsahuje tři základní kroky: a) transport a zachycení mRNA z jádra (zárodečného váčku) do MO pomocí difuzně-zachytávacího mechanismu, b) hromadění těchto mRNA v nejvegetálnější části MO, která se nazývá METRO oblast a za c) jejich výsledný transport a uchycení ve vegetálním kortexu (Kloc and Etkin, 1995; Zhou and King, 1996a). Na rozdíl od dráhy pozdní (viz kapitola 3.2.2) dochází k přesunu mRNA jen do určité části kortexu, do tzv. vegetálního disku (Kloc and Etkin, 1995).

Při formování mitochondriálního oblaku dochází k transportu mRNA z jádra především volnou difuzí a k jejich zachycení uvnitř MO bez potřeby cytoskeletu. Tento jev je nazýván jako tzv. difuzně-zachytávací mechanismus (diffusion-entrapment mechanism). Dojde tak k zachycení mRNA a její dočasné imobilizaci pomocí endoplazmatického retikula (Zhou and King, 1996b; Chang *et al.*, 2004). Podobný difuzně-zachytávací mechanismus nalezneme například i u mouchy *Drosophila*, kdy k výslednému zachycování v Balbianiho tělísku jakožto období mitochondriálního oblaku, dochází také bez účasti cytoskeletu (Castillon *et al.*, 2003). Některé mRNA, například *Xcat2*, se však do MO dostávají díky mikrotubulům a molekulárnímu motoru kinesinu II. Jedná se zhruba o 25% všech mRNA využívajících časnou transportní dráhu. To, jaký počet mRNA a jak rychle jsou zachyceny v MO závisí na množství ATP v oocyту a teplotě (Heinrich and Deshler, 2009). Ve své studii Heinrich a Deshler zjistili, že k transportu v oocytech docházelo až dvakrát rychleji, když byly inkubovány při 30°C, než při 18°C. Zároveň bylo zjištěno, že hladina ATP v oocytech koreluje s funkcí ATPázových molekulárních motorů jako kinesinu II transportujících mRNA po mikrotubulech (Heinrich and Deshler, 2009).



METRO dráha ve stádiu III zaniká a již dále nefunguje, další mRNA jsou již do vegetálního kortexu transportovány pomocí pozdní transportní dráhy. Molekuly mRNA i germinální granula zůstávají zakotveny do kortexu a to i po oplození, na rozdíl od mRNA pozdní dráhy (Forristall *et al.*, 1995).

V MO se nachází struktury bohaté na  $\gamma$ -tubulin, které patrně fungují jako centra organizující mikrotubuly (MTOC) v pozdějších stádiích oogeneze a podílející se tak na pozdní transportní dráze (Kloc and Etkin, 1998). K zachycení a přesunu mRNA a germinálních granul do vegetálního kortexu dojde ještě před rozpadem MO (Wilk *et al.*, 2005). Tento poslední krok časné transportní dráhy není a nebyl ani v minulosti častým předmětem experimentů, na rozdíl od předešlých kroků této dráhy. Proto je nutné dodat, že informace k tomuto poslednímu kroku časného transportu jsou často velmi fragmentované a nedostatečné a mechanismus rozpadu mitochondriálního oblaku a jeho přesunu s přidruženými mRNA a germinálními granuly do vegetálního kortexu zůstává neznámý (Wilk *et al.*, 2005).

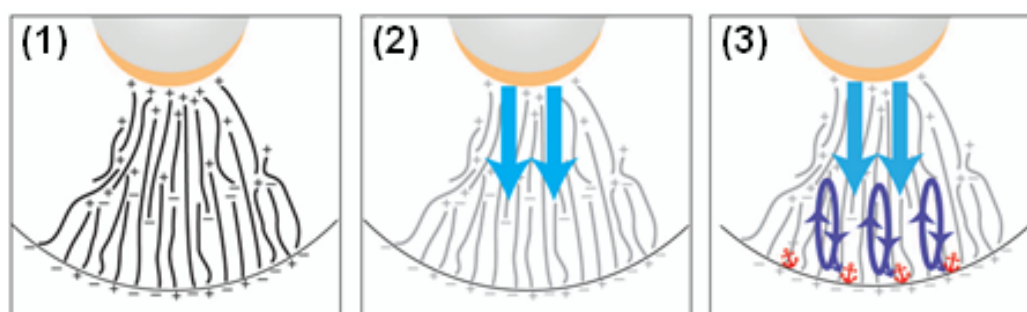
Typickými transkripty využívající k přesunu časnou METRO dráhu jsou tzv. determinanty zárodečné plazmy jako *Xcat2*, *Xpat*, *XDazl*, *DeadSouth*, *Xsirts* a další (Zhou and King, 1996a; Kloc *et al.*, 2002; Claußen and Pieler, 2010).

### 3.2.2 Pozdní (Vg1) transportní dráha

V čase, kdy v oocytech probíhá časná METRO dráha, jsou mRNA transportované pozdní drahou již transportovány ven z jádra a jsou rovnoměrně rozprostřeny v cytoplazmě mimo oblast mitochondriálního oblaku (Kloc and Etkin, 1998; Claußen and Pieler, 2010). Až ve stádiu II, popřípadě III, se začínají hromadit zhruba v oblasti původního MO (Kloc and Etkin, 1995) a perinukleární oblasti u jádra a jsou za účasti mikrotubulů přesouvány a pomocí aktinových mikrofilament a cytokeratinových filament ukotvovány v kortexu a to ve stádiích IV-VI (Yisraeli *et al.*, 1990; Kloc *et al.*, 2007; Claußen and Pieler, 2010; Gagnon *et al.*, 2013). Po přesunu mRNA pozdní drahou se tato mRNA nachází rovnoměrně rozprostřená ve vegetálním kortexu oocyty (Kloc and Etkin, 1995). Ne všechny mRNA musí být zakotveny do kortexu, některé zůstávají volně v cytoplazmě vegetální polokoule (Gagnon *et al.*, 2013). Ačkoli je *Vg1* velmi často používaným modelem pro výzkum pozdní (Vg1) dráhy a mechanismu kotvení mRNA do kortexu, v experimentu provedeném Forristall *et al.* byly nalezeny jeho subpopulace nezakotveny v kortexu, ale nacházející se v cytoplazmě v okolí žloutkových váčků (Forristall *et al.*, 1995).

Mezi nejtypičtější mRNA transportované pozdní drahou jsou *Vg1*, *VegT* či *XDead-end* (Xanthos *et al.*, 2001; Horvay *et al.*, 2006). *Vg1* byla první objevená molekula mRNA v oocytech a jedná se o transkript pro protein z TGF- $\beta$  rodiny silně ovlivňující vznik mesodermu (Thomsen and Melton, 1993; Birsoy *et al.*, 2006). *VegT* je determinantem vzniku endodermu fungující jako transkripční faktor. Je také schopen aktivovat expresi některých genů již před stádiem střední blastuly. Po oplození se dostává do dorzálně-animální oblasti oocyty a je jedním ze základních molekul řídících tvorbu dorzálně-vegetální osy (Xanthos *et al.*, 2001; Skirkanich *et al.*, 2011; Sudou *et al.*, 2016). Ortolog *VegT* se nachází i u jiných skupin žab, kde je ovšem většinou lokalizován v animální polokouli (Sudou *et al.*, 2016). Zajímavostí je molekula *XDead-end*, která je dosud jediným známým determinantem zárodečné plazmy, který ke svému přesunu do vegetálního kortexu využívá pozdní dráhu (Horvay *et al.*, 2006).

V dnešní době je známo, že mikrotubuly mohou být orientovány do kortexu svými mínus či plus konci (Gagnon *et al.*, 2013). Transport je podle polarity mikrotubulů prováděn více typy molekulárních motorů jako kinesiny (kinesin I a kinesin II) či dyneiny a může trvat až několik hodin (Messitt *et al.*, 2008; Gagnon *et al.*, 2013). Molekuly mRNA mohou využívat ve svém transportu jeden či oba typy motorů. Jedním z transkriptů využívající oba typy motorů je *Vg1*, jehož transport je znázorněn na Obr. 4. Nejprve je z tzv. perinukleárního prostoru u jádra, kde se začne ve stádiu II-III hromadit, transportován pomocí dyneinu k minus konci mikrotubulů do vnější oblasti cytoplazmy, kde následně nasedá na kinesin s mikrotubuly končící v kortexu svými plus konci. Následně je v několika cyklech ukotven do kortexu. Dynein zřejmě hraje roli i při napojení mRNA na kinesin. Nejspíše rekrutuje samotný kinesin, zprostředkovává jeho přesun a vazbu na mRNA nebo proteiny asociované s mRNA. (Gagnon *et al.*, 2013).



**Obr. 4 : Na mikrotubulech závislý transport mRNA do vegetální polokoule a vegetálního kortexu;** černě a šedě jsou značeny mikrotubuly s příslušnou orientací svých + a – konců; šedě značeno jádro, oranžově perinukleární prostor; (A) schéma mikrotubulů vegetálního kortexu orientovaných svými + i – konci do cytoplazmy a kortexu; (B) Transport pozdních mRNA do vegetální polokoule a kortexu; (C) Transport a následné cykly zachytávání mRNA do kortexu; Převzato z (Gagnon *et al.*, 2013).

U extrémně vegetálních molekul, které musí být pevně ukotveny ve vegetálním kortexu, nemusí napoprvé dojít k vazbě na membránu a dochází tak k jejich koloběhu dokud nedojde ke správnému uchycení (Gagnon *et al.*, 2013). Na zachycování a udržení mRNA ve vegetálním kortexu se, mimo již zmíněné další faktory, podílí více typů cytoskeletu a to aktinová a cytokeratinová filamenta. Tato jejich funkce byla potvrzena experimenty s použitím mikroinjekcí cytochalasinu B do oocytů vedoucí k depolymerizaci aktinu, inhibitorů cytokeratinových filament (Alarcón and Elinson, 2001) a nokodazolu, který způsobuje rozpad mikrotubulů. Po rozpadu aktinové či cytokeratinové sítě došlo k vyplavení některých transkriptů z kortexu, po rozpadu mikrotubulů nedošlo k transportu mRNA, ale na již zachycené molekuly to nemělo vliv (Kloc and Etkin, 1995; Alarcón and Elinson, 2001). Vystává zde tedy hypotéza, že mezi aktinovými vlákny a cytokeratinovými mikrofilamenty a mRNA musí docházet k vzájemné interakci, protože při poškození pouze jednoho typu cytoskeletu nedochází k zachycení ani udržení všech mRNA v kortexu (Alarcón and Elinson, 2001).

### 3.2.3 Střední transportní dráha

Některé mRNA se však vymykají tomu, aby byly striktně zařazeny k transportu pomocí METRO či Vg1 dráhy. Zdá se, že částečně využívají obě tyto transportní dráhy. Ve stádiu I-II jsou akumulovány do MO, ale poté nejsou transportovány pomocí posunu mitochondriálního oblaku do úzkého disku vegetálního kortexu, ale využívají pozdní dráhu k přesunu do kortexu. Tyto transkripty se nachází v kortexu rozloženy po podstatně větší části, stejně jako transkripty pozdní transportní dráhy (rozložení transkriptů pozdní dráhy je zobrazeno na Obr. 3) (Chan *et al.*, 1999; Betley *et al.*, 2002). Jedná se například o mRNA *Xlerk*, *C3H-3* (Betley *et al.*, 2002), *fatvg* (Chan *et al.*, 1999) nebo *Hermes* (Zearfoss *et al.*, 2004).

## 4 Asymetrické rozdělení informačních molekul

Asymetrie oocytů v čase i v prostoru je nejdůležitějším aspektem pro vznik specializovaných buněk nového jedince (Onjiko *et al.*, 2015; Sidova *et al.*, 2015). Prvotní osa je tvořena již v nejčasnějších stádiích vývoje a označujeme ji jako animálně-vegetální. Je to jediná osa, která se tvoří ještě v neoplozeném oocytu, ale zároveň přetrvává až do stádia 18 buněčného embrya (Flachsova *et al.*, 2013). Tato osa je tvořena rozdílným umístěním organel, koncentrací žloutku, germinálních granul, cytoskeletu a gradienty molekul (především mRNA a proteinů), především tzv. „determinantů buněčného osudu“ (cell fate determinants). Tyto determinanty

(specifické proteiny a mRNA) ovlivňují časoprostorovou expresi proteinů v jednotlivých buňkách budoucího embrya (Sidova *et al.*, 2015). Může se jednat například o transkripční faktory, proteiny ovlivňující represi a aktivaci translace různými mechanismy či proteiny podílejícími se na transportu a rozmístění dalších molekul. V novějších výzkumech se čím dál tím častěji potvrzuje, že právě asymetrické rozložení determinantních molekul podle animálně-vegetální osy je naprosto nepostradatelný krok, bez kterého by se embryo nemohlo diferencovat podle dalších tělních os a nevznikly by jednotlivé specializované buňky nového jedince (Flachsova *et al.*, 2013; De Domenico *et al.*, 2015). Tyto determinanty vznikají a jsou asymetricky rozloženy v oocytech již při oogenezi a k jejich expresi v proteiny dochází po oplození v čase brzké embryogeneze (Flachsova *et al.*, 2013). Rozdílný osud buněk v embryu jsou mimo asymetrické rozložení molekul také ovlivněny rozdílnou časoprostorovou regulací translace a degradace molekul (Sindelka *et al.*, 2018). Některé tyto mechanismy jsou diskutovány v kapitole 5.

Nejvíce studií a experimentů z hlediska ustanovení animálně-vegetální osy je prováděno na molekulách mRNA, popřípadě na proteinech, které v oogenezi a později po oplození tyto mRNA ovlivňují. Proto se zbylé kapitoly věnují především těmto mRNA a proteinům.

#### 4.1 Rozdělení mRNA a proteinů

Během oogeneze probíhá bouřlivá transkripce velkého množství mRNA, jelikož před oplozením v oocytu musí být již přepsány do mRNA všechny geny potřebné až do stádia střední blastuly (Flachsova *et al.*, 2013). Z celého kortexu oocytu může být vyizolováno až cca 66 ng různých mRNA (Cuykendall and Houston, 2010). Zatím nebyla nalezena žádná mRNA která by byla rovnoměrně lokalizována v nematurovaných oocytech drápatky, i když se to předpokládá. K rovnoměrnému rozprostření některých mRNA dochází až v různých stádiích po oplození. To podporuje dlouho uznávaný fakt, že budoucí tělní plán je ovlivněn především asymetrií/gradientsy biomolekul v oocytech (Sidova *et al.*, 2015; Sindelka *et al.*, 2018). Prozkoumanější částí z hlediska obsahu i transportních drah je vegetální hemisféra, i když se ukazuje, že v animální můžeme nalézt větší diverzitu mRNA (Sindelka *et al.*, 2018) a v embryogenezi se zdají být mRNA z tohoto pólu translačně aktivnější (De Domenico *et al.*, 2015).

Lokalizaci jednotlivých mRNA můžeme rozdělit do 4 skupin: extrémně vegetální, vegetální, animální a nově vytvořenou skupinu extrémně animálních. Rozdíl mezi extrémně vegetálními

a vegetálně polarizovanými mRNA je v jejich 3'UTR oblasti, které nesměřují danou mRNA jen do daného pólu, ale přímo do kortexu. Za extrémně animální jsou považovány ty, které se dostanu nejdále od jádra směrem ke kortexu animální polokoule (cca do první třetiny animální polokoule) a je jich velmi málo (cca 3% všech animálních) (Sindelka *et al.*, 2018). V animálním pólu totiž nedochází k jejich zabudovávání do kortexu (Nijjar and Woodland, 2013a). Extrémně vegetální jsou determinanty zárodečné plazmy, ale i mRNA důležité pro reprodukci, regulátory genové exprese a tvorbu tělního plánu (Sindelka *et al.*, 2018).

V nematurovaných oocytech se nachází více netranslatovaných mRNA než maturovaných proteinů. Nejméně proteinů se nachází v animálním pólu (Sindelka *et al.*, 2018). Pokud jsou mRNA translatovány v neoplozeném oocytu a zůstávají v cytoplazmě či kortexu, jedná se většinou o proteiny strukturní, regulační či jinak potřebné pro vznik plně funkčního oocytu a embrya (Boke *et al.*, 2016). Některé molekuly můžeme ještě před oplozením v oocytu nalézt jak ve formě transkriptů, tak již hotových proteinů s odlišnou funkcí a lokalizací, než může mít daný protein v průběhu embryogeneze. K přepisu některých těchto mRNA dochází již v brzkých stádiích oogeneze. Například molekuly mRNA *Xpat* jsou součástí zárodečných granul a časnou transportní drahou jsou přesouvány do vegetálního kortexu zatímco maturovaný Xpat protein se v časných stádiích oocytu nachází v jádře (Machado *et al.*, 2005).

Po translaci jednotlivých mRNA do proteinů i ve stádiu blastuly můžeme nalézt podobný vzor jejich rozmístění, jako byl u molekul mRNA. Proteiny mohou být umístěny striktně na animálním či vegetálním pólu nebo mohou být rovnoměrně rozprostřené v cytoplazmě oocytu. Proteiny vzniklé z mRNA animální části v této polokouli zůstávají či jsou rovnoměrně rozprostřeny po cytoplazmě oocytu, ty z vegetální polokoule v ní většinou zůstávají. Molekuly mRNA byly tedy pravděpodobně nejprve transportovány na dané místo v oocytu a až poté došlo k translaci v proteiny. Existují ovšem i výjimky, jako *Trim36* mRNA a protein Trim36 či *Mcts* a protein Mcts1. Mohou být například způsobeny specifickým aktivním transportem proteinů bezprostředně po translaci (Sindelka *et al.*, 2018).

Mezi významné strukturní proteiny patří Xvelo (jinak také Velo1) a XNOA36, které jsou nejspíše jedny ze strukturních proteinů MO podílejících se na jeho stabilitě a druhý zmíněný i na následném ukotvení mitochondrií a mRNA ve vegetálním kortexu (Vaccaro *et al.*, 2012; Boke *et al.*, 2016). Xvelo interaguje s MO přes svou prionovou doménu na N-konci a pravděpodobně vytváří jakousi síť, do které jsou zachytávány a postupně shlukovány mitochondrie a mRNA při

tvorbě mitochondriálního oblaku. Tento protein a tím i životnost MO mohou být regulovány pomocí fosforylace (Boke *et al.*, 2016). Xvelo je vysoce homologní k proteinu BuckyBall u ryby *Danio rerio*, který je také významnou strukturní součástí Balbianiho tělíska (Bontems *et al.*, 2009). Dalšími proteiny potřebnými pro správný vznik zárodečných granul a budoucí zárodečné plazmy jsou Xpat (Machado *et al.*, 2005), DEADSouth (Yamaguchi *et al.*, 2012) a další. Významný strukturní protein potřebný pro správné fungování cytoskeletu je protein 4.1 nalezený původně v červených krvinkách. Pravděpodobně tvoří spojovací protein mezi aktinovým cytoskeletem a cytokeratinovou sítí umožňující jejich vzájemnou regulaci (Carotenuto *et al.*, 2009).

#### 4.2 Molekulární podstata transportu mRNA

Mechanismus lokalizace mRNA spočívá v několika základních faktorech. Jde především o specifické lokalizační motivy v 3'UTR oblastech samotných mRNA, tzv. „zipcode“ sekvence, které řadíme do lokalizačních cis-elementů (cis-acting elements). Souhrnně je tato celá 3'UTR oblast obsahující mnoho různých motivů nazývána jako lokalizační element (LE). Zatím bylo nalezeno přes 40 lokalizačních motivů pro vegetální a téměř 30 pravděpodobných motivů pro extrémně animální transport rozdělených do několika skupin (většina má stejně dlouhé Poly-C, poly-U, G bohaté motivy či motivy obsahující AAUAAA sekvenci). Motivy pro vegetální lokalizaci byly rozděleny do 14 rodin (G bohaté, Poly-A, poly-C, Poly-U, CAC-bohatý motiv atd.). U extrémně animálních mRNA zde tedy vyvstává otázka k hledání nových mechanismů a aktivních drah vedoucích k lokalizaci těchto mRNA do 1/3 animální polokoule. Je ovšem možné, že tyto motivy pro extrémně animální mRNA se mohou nacházet i v 5'UTR oblastech nebo dokonce kódujících částech mRNA (Sindelka *et al.*, 2018).

Mezi nejčastěji nalezené motivy potřebné k transportu patří tzv. motivy E2 se sekvencí UUCAC (Kwon *et al.*, 2002), R1 (Chang *et al.*, 2004) dále pak VM1 a CM1 (Bubunencko *et al.*, 2002; Snedden *et al.*, 2013). V 3'UTR oblastech některých mRNA drápatky byly nalezeny i další motivy a vlásenkovité struktury zatím s neznámým významem (Sindelka *et al.*, 2018). K problémům s transportem dochází ve chvíli, kdy dojde k mutaci v těchto lokalizačních motivech. R1 motivy jsou potřebné pro vazbu regulačních proteinů (viz níže) pro transport do mitochondriálního oblaku. U nahrazení všech R1 motivů E2 motivy došlo k více než polovičnímu snížení akumulace mRNA v mitochondriálním oblaku. Naopak při nahrazení E2 motivů R1 motivy nedošlo k žádné změně vůči obsahu mitochondriálního oblaku (Chang *et al.*, 2004). E2

motivy jsou důležité pro transport a zachycení ve vegetálním kortexu oocyty. Pokud vznikla mutace v E2 motivech mimo „UUCAC“ sekvenci došlo k transportu a uchycení transkriptů v daleko menší míře než za ideálních podmínek. Při mutaci v „UUCAC“ části motivů, nedošlo k navázání proteinu Vera (viz níže) a tudíž k žádnému transportu nedošlo (Kwon *et al.*, 2002). Bylo dokonce ukázáno, že motivy E2 a R1 se v případě mutace v druhém motivu mohou částečně funkčně nahrazovat (Chang *et al.*, 2004). U rozdílných mRNA mohou být tyto motivy shodné avšak poskládané do jiného vzoru, jak bylo zjištěno u nejvýznamnějších transkriptů pozdní dráhy *Vg1* a *VegT* (Bubunencko *et al.*, 2002). Další nalezené motivy E1, E3 a E4 pravděpodobně nejsou přímo potřebné k transportu, ale jen k uchycení v kortexu (Kwon *et al.*, 2002).

Zajímavostí je, že transkripty putující do animální i vegetální polokoule časnou i pozdní drahou mají tyto lokalizační „zipcode“ motivy skoro shodné či minimálně velmi podobné a zaměnitelné (Snedden *et al.*, 2013). Bylo to potvrzeno experimentem, kdy byly do oocyty drápatky ve stádiu I injikovány mRNA *Vg1* bez mutace a *Vg1* s mutací v tomto lokalizačním motivu. *Vg1* je typickým transkriptem pozdní transportní dráhy. Nemutovaný *Vg1* byl bez problémů transportován časnou transportní drahou do vegetálního kortexu, u mutovaného *Vg1* k žádnému transportu nedošlo (Choo *et al.*, 2005). Transkripty pozdní dráhy se tedy bez problémů mohou účastnit časných dráh, naopak i transkripty časných dráh se *in vitro* bez problémů mohou transportovat do vegetálního kortexu drahou pozdní. Tyto mRNA METRO časných dráh injikované do stádia IV byly do kortexu přesouvány dokonce s větší efektivitou než mRNA pozdní dráhy, pravděpodobně tyto mRNA mají silnější lokalizační elementy (Choo *et al.*, 2005). Důvody, proč jsou mRNA transportovány rozdílnými drahami se tedy musí hledat jinde.

Na tyto cis-elementy se totiž váží trans-elementy (trans-acting elements) z řad proteinů, které se souhrnně nazývají RNA vazebné proteiny (RBP) a spolu tak s mRNA tvoří ribonukleoproteinové komplexy (RNP). Tyto komplexy ovlivňují následný osud dané mRNA a to od jejího transportu a zachycení až po umlčení či naopak regulaci translace (Lewis and Mowry, 2007). Rozlišují se dva primární typy komplexů a to jaderný RNP komplex a poté cytoplazmatický RNP komplex (Kress *et al.*, 2004). Složky RNP mohou být na mRNA vázány přímo a tvořit tak vazbu mRNA-protein nebo mohou být vázány nepřímo přes jeden či více dalších proteinů (Lewis *et al.*, 2008). Tento mechanismus byl nalezen i v jiných somatických

buňkách, většinou ovšem stačí jen vazba jednoho proteinu na lokalizační element mRNA. V oocytech jsou nejčastěji RNP komplexy tvořeny větším množstvím různých proteinů potřebných k transportu a ještě dalšími, které tyto komplexy stabilizují (Bauermeister *et al.*, 2015). Recentně popsáním typem RNP komplexu v oocytech drápatky vodní je skupina tzv. L-tělísek (L-bodies), neboli lokalizačních tělísek. Jedná se o velké ribonukleoproteinové komplexy, které jsou typické pro transport některých mRNA do vegetálního kortexu oocyty. V těchto lokalizačních tělískách se může nacházet zároveň mnoho kopií příslušných mRNA, na rozdíl od většiny RNP komplexů, které tvoří skupina RBP proteinů vázaných na jedinou molekulu mRNA (Wood *et al.*, 2020).

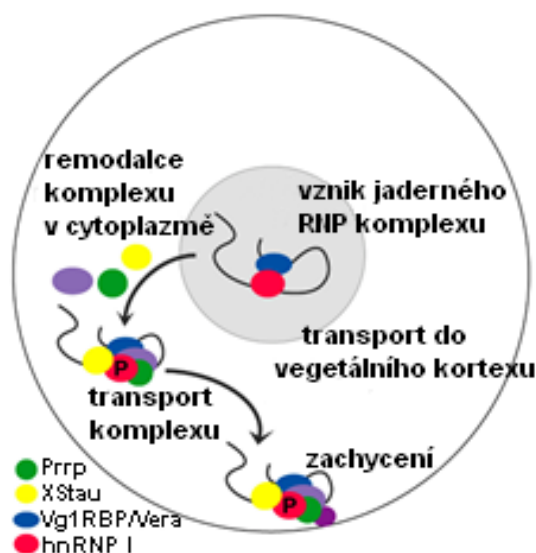
Tyto RNP komplexy jsou mnohokrát přestavovány a modifikovány, aby mohl být kontrolován a regulován každý krok v cestě mRNA (Varnum and Wormington, 1990; Lewis and Mowry, 2007; Lewis *et al.*, 2008). Ukazuje se, že mechanismus vzniku a přestaveb RNP je nejspíše hluboce evolučně konzervován. K těmto mnohonásobným přestavbám může docházet mnoha způsoby: homodimerizací, heterodimerizací, regulací RNA helikázou, interakcemi mezi jednotlivými složkami RNP komplexu nebo pomocí posttranslačních modifikací jednotlivých proteinů RNP komplexu (Lewis and Mowry, 2007). Nejčastější modifikací je fosforylace, která může vést k rozdílné lokalizaci fosforylovaného a nefosforylovaného proteinu. Například fosforylovaný protein PTB (polypyrimidine tract-binding protein; tvořící komplex PTB/hnRNP) se nachází pouze v cytoplazmě zatímco jeho nefosforylovaná forma pouze v jádře. Fosforylaci na Ser-16 dochází k ovlivnění jaderného lokalizačního signálu a jaderného exportního signálu tohoto proteinu (Xie *et al.*, 2003).

Mimo to, že jsou sdílené základní mechanismy transportu mRNA pro jednotlivé dráhy i finální místa zachycení, existují i některé společné proteiny RNP komplexů shodné pro animální i vegetální transport a obě jeho dráhy. Žádné RNA vazebné proteiny specifické jen pro mRNA lokalizované v animální polokouli zatím nejsou potvrzeny. Známých je jen několik proteinů asociovaných také s pozdní transportní drahou vegetální polokoule, jako jsou např.: Prpp (Zhao *et al.*, 2001), Staufen (také XStau) (Snedden *et al.*, 2013) a 40LoVe (Kroll *et al.*, 2009). Tyto proteiny se před přesunem do vegetální polokoule se nachází v cytoplazmě animálního pólu a je možné, že asociují i s mRNA *An1* a *An3* (Zhao *et al.*, 2001; Kroll *et al.*, 2009; Snedden *et al.*, 2013).



Mezi nejvýznamnější proteiny podílející se na tvorbě RNP komplexů obecně patří Hermes (Aguero *et al.*, 2016), komplex Vg1RBP/Vera (Kwon *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2004), 40LoVe (Kroll *et al.*, 2009), Prpr (Zhao *et al.*, 2001), Staufen (nebo také XStau) (Yoon and Mowry, 2004; Takahashi *et al.*, 2018), Celf1, Trim36 (Bauermeister *et al.*, 2015), XveloFL, SveloSv, Rbm24b, Rbm42b (Nijjar and Woodland, 2013b) a další.

Protein Hermes interaguje s transkripty jako *nanos1* (jinak také *Xcat2*), je součástí RNP komplexu již v jádře a napomáhá transportu těchto mRNA z jádra a jejich uchycení v mitochondriálním oblaku. Tento komplex zároveň pomáhá s formováním samotných germinálních granul (Aguero *et al.*, 2016). Protein Prpr po vazbě na příslušnou mRNA se váže přes protein profilin na aktinová filamenta a pravděpodobně podporuje jejich polymeraci (Zhao *et al.*, 2001). Protein Trim36, specifická ubiquitin ligáza, po oplození zůstává zakotvený ve vegetálním kortexu, jelikož reguluje polymerizaci mikrotubulů potřebných pro kortikální rotaci a přesun dorzálních determinantů potřebných k dorzalizaci embrya (Cuykendall and Houston, 2009). Protein Staufen je asociován s molekulárním motorem kinesinem I a pravděpodobně je adapterovým proteinem mezi tímto motorem a samotnou mRNA (Yoon and Mowry, 2004; Takahashi *et al.*, 2018). U oocytů ryby *Danio rerio* je Staufen také nepostradatelným článkem transportu mRNA, avšak do animální polokoule (Takahashi *et al.*, 2018).



**Obr. 6:** Cesta *Vg1* od počátku transkripce v jádře až po uchycení ve vegetálním kortexu, zobrazeno s nejdůležitějšími složkami RNP komplexu pro transkript *Vg1* jako Prpr, XStau, Vg1RBP/Vera a hnRNP I; jednotlivé proteiny RNP komplexu popsány v legendě obrázku; Převzato a přeloženo z (Kress *et al.*, 2004).

Z hlediska postupného vývoje RNP komplexu v oocytech je nejznámějším příkladem RNP komplex u molekuly *Vg1*. U této mRNA jsou známy dvě nejdůležitější molekuly tvořící RNP a to Vera (tvoří spolu komplex Vg1RBP/Vera) a komplex PTB/hnRNP (Cote *et al.*, 1999; Lewis *et al.*, 2008). Pravděpodobně nejdříve dojde ke vzniku komplexu PTB/hnRNP po vazbě na specifický lokalizační motiv, v tomto případě E2 (Kwon *et al.*, 2002), a na něj se za vzniku vazby protein-protein napojí Vera. Později v cytoplasmě je tento RNP komplex přestavěn, změní se typy i některých vazeb. Vera se tak začne vázat přímo na samotnou mRNA za vzniku vazby protein-RNA (Lewis *et al.*, 2008). Je možné, že Vg1RBP/Vera rekrutují další komponenty RNP komplexu jako Prpr a XStau později v cytoplasmě (Kress *et al.*, 2004). Export *Vg1* z jádra až do vegetálního kortexu je znázorněna na Obr. 6. Pokud dojde k mutaci v některém z komplexů či v lokalizačních elementech pro tyto komplexy, nedojde ke stabilní vazbě ani jednoho z komplexů a *Vg1* není transportován a uchycen do vegetálního kortexu (Lewis *et al.*, 2008). Většinu těchto elementů potřebných k transportu nejspíše *Vg1* RNA sdílí s dalším významným transkriptem pozdní dráhy, *VegT*. A to i přes fakt, že podobnost těchto dvou transkriptů v LE je velmi malá (Bubunenko *et al.*, 2002).

## 5 Regulační mechanismy ovlivňující osud mRNA

Dalším důležitým krokem pro pozdější správný vývoj embrya je regulace vytvořených molekul mRNA a proteinů a to většinou již mimo období oogeneze. Ne všechny mRNA jsou později přepsány do proteinů, některé jsou degradovány či umlčeny a to především na budoucí ventrální straně embrya (Onjiko *et al.*, 2015). K těmto regulacím dochází v momentech od maturace oocytů přes proces oplození a v brzké embryogenezi. Ke správnému vzniku nového jedince je potřeba regulace translace jednotlivých mRNA či jejich degradace v čase i prostoru. K těmto regulacím dochází většinou přes specifickou sekvenci v 3'UTR oblasti transkriptů a to pomocí nejrůznějších posttranskripčních a posttranslačních modifikací (Smits *et al.*, 2014) nebo například pomocí miRNA a dalších nekódujících RNA. Některé mRNA mohou však být regulovány více mechanismy zároveň, jako například mRNA pro cyklin E1 je regulován pomocí CPEB i maternálních miRNA (Wilczynska *et al.*, 2016).

## 5.1 Regulace pomocí miRNA a nekódujících RNA

V oocytech nalezneme i molekuly RNA, které sice nic nekódují, ale zásadně ovlivňují a regulují osud kódujících mRNA a proteinů. Jedná se především o miRNA a lncRNA.

Molekuly microRNA (miRNA) jsou nekódující RNA, které mohou posttranskripčně ovlivňovat specifické mRNA, ke kterým jsou komplementární. V budoucím embryu umožňují především regulaci budoucích buněk ektodermu a nervové soustavy (Shah *et al.*, 2017). Podobně jako mRNA jsou v oocytech asymetricky lokalizovány a mohou tak také mít vliv na osud jednotlivých buněk po oplození a rýhování (Sidova *et al.*, 2015). Jsou transkribovány v jádře nejdříve až po mírném posunu jádra (zárodečného váčku) do animální polokoule. Způsob, jakým jsou asymetricky lokalizovány v oocytu není známý. Nicméně některé miRNA vykazovaly v experimentech Sidova *et al.* stejné rozložení v oocytech jako mRNA, se kterými hybridizují v jejich 3'UTR oblastech a tvoří tak s nimi komplex mRNA-miRNA. Lze proto předpokládat, že u některých miRNA (či pre-miRNA) může dojít k transportu pomocí jejich komplementárních mRNA a využití jejich transportních mechanismů. Jednalo by se o pravděpodobně o mRNA pozdní dráhy, zatím nebyly objeveny žádné miRNA vázající se na mRNA v mitochondriálním oblaku. Samotné molekuly miRNA neobsahují žádné známé lokalizační motivy potřebné pro transport. Do animálního pólu ovšem mohou být lokalizovány nejspíše pasivní difuzí stejně jako další molekuly. Nebyly zatím nalezeny miRNA, které by byly lokalizovány extrémně vegetálně, zakotveny ve vegetálním kortexu (Sidova *et al.*, 2015).

Molekuly miRNA vedou k místně i časově specifické degradaci mRNA či k jejich translačnímu umlčení pomocí proteinového komplexu RISC (RNA-induced silencing complex) obsahující například Argonaute protein (Sidova *et al.*, 2015; Shah *et al.*, 2017; Sindelka *et al.*, 2018). Více miRNA z hlediska množství i druhů vzniká až po ovulaci a v následných stádiích (Watanabe *et al.*, 2005). Molekuly miRNA můžeme rozdělit na 3 skupiny, kdy skupina I se nachází v oocytech v celém pozdějším vývoji, miRNA skupiny II jen v časově ohraničených úsecích (například jen ve stádiu blastuly či gastruly) a miRNA skupiny III od stádia střední blastuly až do stádia pulce (Watanabe *et al.*, 2005). V závislosti na stádiu buněčného cyklu ovšem mohou mít miRNA nejen umlčovací funkci, ale byl nalezen i na miRNA závislý mechanismus aktivace translace některých mRNA (Rocha *et al.*, 2007). Nejprve byl tento mechanismus objeven v savcích buňkách a u člověka (Rocha *et al.*, 2007) a později v roce 2011 byl potvrzen i v oocytech drápatky na mRNA pro protein Myt1 (Mortensen *et al.*, 2011). K této aktivaci u člověka dochází

po vzniku komplexu proteinů AGO2 a FXR1 s miRNA vázané na komplementární U-bohatou sekvenci v 3'UTR oblasti regulované mRNA (Rocha *et al.*, 2007). U drápatky tato aktivace translace přes miRNA byla potvrzena jen do události maturace oocytů a dochází k ní přes xLAGO a FXR1, což jsou homology k těm lidským. Přesný mechanismus zůstává nezjištěn, ale pravděpodobně je závislý na cAMP/PAK signalizaci a společně brání maturaci těchto oocytů (Mortensen *et al.*, 2011). K regulaci translace maternálních transkriptů je mechanismus miRNA využíván i u dalších živočichů, například u myši (Murchison *et al.*, 2007).

Mezi další významné nekódující RNA patří *Xlsirt* neboli *Xenopus laevis* short interspersed repeat transcripts. Jedná se o skupinu RNA obsahující dlouhé nekódující a opakující se sekvence, které nemohou být přepsány v proteiny. Mohou být jednovláknové i dvouvláknové. Nejčastěji se transportují METRO časnou drahou a pomocí mitochondriálního oblaku (Kloc and Etkin, 1994). Obsahují v sobě cis-lokalizační elementy potřebné k jejich přepravě do vegetálního kortexu (Allen *et al.*, 2003), kde umožňují zachycení a vazbu dalších mRNA v kortexu v čase. Po delecii těchto RNA došlo po pár dnech k vyvázání mRNA (např. pro protein Vg1) z kortexu (Kloc and Etkin, 1994; Kloc *et al.*, 2005). Také společně s již kódující mRNA *VegT* podporují cytotkeratinovou síť a v jejich nepřítomnosti se tato síť zcela rozpadá, nedochází ke správné formaci MO a zárodečných granul a ani správnému transportu a zachycování transkriptů do kortexu. *Xlsirts* se shlukují do dvou různých odlišně velkých oblastí. Menší oblast podporuje cytotkeratinovou síť, větší se pravděpodobně účastní formování germinálních granul (Kloc *et al.*, 2005).

## 5.2 Regulace translace závislá na CPE, MBE a PBE

Regulace translace jednotlivých mRNA je opět spojena s motivy v 3'UTR oblastech těchto transkriptů. Jedná se zejména o sekvence CPE (CPE binding element) a na ni se vázající CPEB proteiny, MBE (Musashi binding element) a proteiny Musashi a Musashi2 (Rutledge *et al.*, 2014; Cragle *et al.*, 2019) a PBE (Pumilio binding element) a protein Pumilio (také označován jako XPum) (Nakahata *et al.*, 2003). Toto jsou jen nejzákladnější sekvence a na ně se vázající nejznámější a nejprozkoumanější proteiny fungující jako regulátory translace v oocytech.

Tyto proteiny většinou vytváří komplex s danou mRNA navázané na příslušné sekvence a tvoří tak s dalšími molekulami dočasně neaktivní enzym potřebný k polyadenylaci. Tyto komplexy se tvoří již v nematurovaných oocytech. K polyadenylaci ovšem dojde až po konformační změně v tomto RNP komplexu (např.: po fosforylaci CPEB), kdy se celý komplex stane aktivní

a může dojít k polyadenylaci transkriptů. Proteiny CPEB, Musashi a Pumilio tedy do jistého času nedovolí, aby došlo k polyadenylaci a tím k procesu translace. Tento proces do té doby reprimují, avšak po změně v RPB komplexu mohou přímo s aktivací napomáhat (Radford *et al.*, 2008).

Jako polyadenylace mRNA se rozumí prodloužení poly(A) konce na 3'konci mRNA. Proces polyadenylace je v oocytech drápatky prvním nezbytným krokem pro správnou iniciaci translace. Na polyadenylovaný poly(A) ocásek se mohou vázat translační iniciační faktory a molekula mRNA se tak může stát translačně aktivní. Molekuly mRNA, které mají být do určitého času umlčeny, mají jen poměrně krátký polynukleotidový ocásek (20-40 nukleotidů), který je specifickou poly(A) polymerázou prodloužen až po fertilizaci (Radford *et al.*, 2008). K aktivaci translace polyadenylací nedochází u daných mRNA ve stejný čas, polyadenylaci transkriptů lze tak rozdělit na časnou a pozdní. Jako časná polyadenylace je označována ta, ke které dojde ještě před rozpadem jádra/zárodečného váčku. K pozdní polyadenylaci dochází až po této události (Charlesworth *et al.*, 2004). Délka 3'UTR oblasti transkriptů pozitivně koreluje s množstvím polyadenylačních regulačních sekvencí. Délka poly(A) ocásků se může měnit u mRNA i v průběhu maturace oocyty. Nejdelší poly(A) ocásky mají v oocytech drápatky mRNA pro proteiny asociované s mitózou (Yang *et al.*, 2020).

Původně se předpokládalo, že mRNA obsahují ve svých 3'UTR oblastech jen jeden z výše uvedených motivů a jsou tak ovlivňovány jen jedním mechanismem. V experimentech Rutledge *et al.* však ukázali, že mRNA *Dnmt1* obsahuje sekvenci CPE i MBE (Rutledge *et al.*, 2014). Zároveň také v experimentech Ota *et al.* byla objevena souvislost mezi fungováním proteinů Pumilio 1 a Pumilio 2 s CPEB proteiny (Ota *et al.*, 2011).

Je ovšem potřeba zmínit, že u většiny polyadenylovaných mRNA sice dojde k aktivaci translace v některém stádiu embryogeneze, avšak u malé skupiny mRNA i po polyadenylaci nebyla objevena expresní aktivita v žádném stádiu. Tyto mRNA byly objeveny recentně. V experimentech bylo potvrzeno, že aktivace translace po polyadenylaci není závislá jen na samotné polyadenylaci, cis-elementech mRNA či dalších příslušných proteinech, ale i na počtu a vzoru uridinových bazí v 3'UTR oblastech těchto transkriptů. Pokud je jejich sekvence v mRNA v 3'UTR oblasti nějakým způsobem nedostatečná, dojde sice k procesu polyadenylace, ale ne k samotné aktivaci translace (Yang *et al.*, 2020).

### 5.3 Další mechanismy regulace a degradace

Kromě výše zmíněných mechanismů nacházíme regulaci u menšího počtu mRNA založených na mnoha jiných principech. V této poslední podkapitole budou uvedeny i tak jen některé, protože uvedení všech by přesáhlo rámec této práce.

Například u *Nanos1* (*Xcat2*) je umlčení a následná aktivace translace závislá na sekundární struktuře downstream (po směru exprese) od AUG start kodonu bránící nasednutí ribozomu. K rozvolnění této sekundární struktury dochází po navázání tzv. translačního kontrolního elementu (TCE) po fertilizaci (Luo *et al.*, 2011).

I methylace reguluje přepis mRNA na proteiny v ještě nematurovaných oocytech, při maturaci oocytů i v časném embryonálním vývoji, ale hlavně při regulaci mRNA pro proteiny potřebné k meiotické maturaci oocyty (Keiper and Rhoads, 1997; Qi *et al.*, 2016). Molekuly mRNA s vysoce methylovanými adenosiny v 5'UTR oblasti vykazovaly daleko menší míru translace v proteiny. Příkladem mRNA utlumených vysokou mírou methylace je *cyklin B2* potřebný pro tvorbu mitotického vřeténka. Obecně se zdá, že se jedná hlavně o transkripty proteinů závislých na ATP. Je možné, že methylace hraje i roli v lokalizaci jednotlivých mRNA (Qi *et al.*, 2016). Tento způsob methylace je důležitý i pro specifickou iniciaci translace nezávislé na rozeznání 5'7-methylguanosinové čepičky. Iniciačními faktory je rozeznáván methyladenosin v 5'UTR oblasti. Tuto na čepičce nezávislou iniciaci translace zajišťují i jiné iniciační faktory jako eIF3, zatímco k obvyklé iniciaci translace závislé na rozeznání 5'7-methylguanosinové čepičky a rekrutování 40S ribozomu je potřeba faktor eIF4. Zatímco využití methylace při tomto způsobu iniciace je u somatických buněk využíván především při vystavení buněk stresu (Meyer *et al.*, 2015), zdá se, že v oocytech je tento způsob častý i před maturací oocytů a to dokonce u esenciálních tzv. housekeeping genů (Keiper and Rhoads, 1997).

K regulaci translace v oocytech dochází i na úrovni represorů jako například proteinu Xcat2 specificky represujícího translaci v zárodečných buňkách. K umlčení translace tímto proteinem může docházet u polyadenylovaných i nepolyadenylovaných mRNA pomocí mechanismu represe založeném na 5'7-methylguanosinové čepičce, pomocí IRES sekvence před navázáním ribozomu a dalšími mechanismy (Lai *et al.*, 2011).

Výše zmíněné mechanismy vedou především k rozdílné translaci mRNA v čase. Pro správný vznik embrya je ale důležitá i rozdílná translace mRNA v prostoru. Některé mRNA jako mRNA

pro cyklin B1 jsou translatovány v každé buňce embrya, avšak k expresi jiných proteinů, jako např xCR1 dochází jen v animálních buňkách embrya, i když transkript tohoto proteinu je také poměrně rovnoměrně rozprostřen ve všech buňkách embrya a u všech transkriptů dochází k polyadenylaci. Ukazuje se, že tyto mRNA obsahují ojedinělou sekvenci v 3'UTR oblasti, přes kterou je ve vegetálních buňkách embrya exprese umlčena. Mohlo by jít o kooperaci této jedinečné oblasti s PBE a CUG-BP1 proteiny a na ně se vázajícími molekulami tvořícími další funkční ribonukleoprotein. Přesný mechanismus není znám (Zhang *et al.*, 2009). K asymetrické expresi *Wnt11* dochází pomocí jiného mechanismu a to místně specifické polyadenylace a tím i translace v dorzální části embrya (Schroeder *et al.*, 1999).

Posledním zmíněným mechanismem regulace asymetrie molekulárních determinantů v oocytech a embryu je na proteasomech závislá degradace proteinů. Může k ní docházet mnohonásobným navázáním molekul ubiquitinu na daný protein a jeho následnou degradací v proteasomech, jako k tomu dochází například u proteinů CPEB (Setoyama *et al.*, 2007) či proteinu Mos (Nishizawa *et al.*, 1993). K navázání ubiquitinu na proteiny, a tím jejich označení k degradaci, dochází u drápatky pomocí SCF<sup>B-TrCP</sup> ubiquitin-ligázy při maturaci oocytů. Byla ale nalezena i dráha degradace proteinů pomocí proteasomů nezávislá na molekule ubiquitinu (Setoyama *et al.*, 2007). Nejspíše je tato dráha degradace závislá na 20S podjednotce proteasomu a jiných proteinech specifických pro jednotlivé molekuly jako je tomu u degradace některých tumor supresorů v somatických buňkách (Asher *et al.*, 2005). Přesný mechanismus na ubiquitinu nezávislé degradace v proteasomech během vzniku zárodečných buněk embrya není podrobně prostudován a nabízí tak další možnosti k výzkumu (Hwang *et al.*, 2019). U drápatky byla tato dráha degradace poprvé experimentálně objevena na mRNA *Dnd1* (*Dead-end1*) a *Trim36* a brání nadměrnému nabohacení těchto proteinů ještě v oocyty (Hwang *et al.*, 2019). K ovlivňování determinantů zárodečné linie buněk touto drahou dochází již v oocytech. Po oplození dochází k přesunu drtivé většiny mRNA pro proteasomy a samotných proteasomů do animální polokoule, tím pádem ve vegetální polokouli dojde k vzrůstu množství proteinů těchto determinantů zárodečné linie buněk (Hwang *et al.*, 2019).

## 6 Závěr

Drápatka vodní (*Xenopus laevis*) je významným modelovým organismem s hojně využívanými oocyty pro základní i klinický výzkum. V oocytech již během oogeneze dochází k ustanovení gradientu molekul podél animálně-vegetální osy, který zásadně ovlivňuje ustanovení tělních os, diferenciaci buněk a správný vývoj embrya. K asymetrickému rozložení molekul (tzv. determinantů buněčného osudu) dochází především časnou (METRO) a pozdní (Vg1) drahou do vegetálního pólu a kortexu a nejspíše difuzí do pólu animálního. K transportu molekul mRNA dochází díky jejich specifickým motivům v 3'UTR oblastech těchto transkriptů a na ně se vázajících komplexů proteinů, ovlivňující osud jednotlivých mRNA. Kromě asymetrického rozložení molekul nalezneme v nematurovaných oocytech i asymetrické rozložení základních organel oocyty jako pozici jádra (zárodečného váčku) v animální polokouli, většinu mitochondrií spolu s endoplazmatickým retikulem ve vegetálním pólu a rozdílnou cytoskeletární strukturu mezi oběma hemisférami. Animálně-vegetální osa přetrvává i po oplození až do časného embryonálního vývoje, i když postupně vznikají nové tělní osy (dorso-ventrální, anterior-posteriorní osa a pravo-levá tělní osa) alespoň částečně vycházející z rozložení molekul v nematurovaném oocyty. Animálně-vegetální osa je také z hlediska jednotlivých mechanismů vzniku a rozložení molekul nejvíce z těchto os prostudována. K přetrvávání a regulaci některých takto rozložených molekul dochází v čase mnoha mechanismy jako regulací translace polyadenylací, vazbou na specifické 3'UTR oblasti mRNA, pomocí miRNA či například cílenou degradací.

I když je drápatka využívána k výzkumům již skoro 100 let a klíčové složky jednotlivých mechanismů jsou známy, představuje ještě poměrně velké pole možností pro další výzkum. Velmi málo je známo například o animální polokouli celkově, o mechanismech transportu molekul do animální oblasti, o mechanismu fungování a samotné funkci některých proteinů RNP komplexů ovlivňující osud jednotlivých mRNA či o molekulárních mechanismech a propojenosti mezi jednotlivými tělními a oocytárními osami. Další výzkum je důležitý i z hlediska toho, že mnoho mechanismů a proteinů je evolučně zakonzervováno a homology těchto proteinů nalezneme i u dalších živočišných druhů včetně člověka.



## 7 Literatura

\* sekundární zdroj

Aguero, T, Newman, K, and King, M Lou (2018). Microinjection of xenopus oocytes. Cold Spring Harb Protoc 24, 92–98.

Aguero, T, Zhou, Y, Kloc, M, Chang, P, Houlston, E, and King, M Lou (2016). Hermes (Rbpms) is a critical component of RNP complexes that sequester germline RNAs during oogenesis. J Dev Biol 4, 1–17.

Alarcón, VB, and Elinson, RP (2001). RNA anchoring in the vegetal cortex of the Xenopus oocyte. J Cell Sci 114, 1731–1741.

Allen, L, Kloc, M, and Etkin, LD (2003). Identification and characterization of the Xlsirt cis-acting RNA localization element. Differentiation 71, 311–321.

Asher, G, Tsvetkov, P, and Kahana, C (2005). Proteasomal Degradation of the Tumor Suppressors P53 and P73. Genes Dev 19, 316–321.

Bauermeister, D, Claußen, M, and Pieler, T (2015). A novel role for Celf1 in vegetal RNA localization during Xenopus oogenesis. Dev Biol 405, 214–224.

Bement, WM, and Capco, DG (1990). Transformation of the amphibian oocyte into the egg: Structural and biochemical events. J Electron Microsc Tech 16, 202–234.

Bement, WM, Sokac, AM, and Mandato, CA (2003). Four-dimensional imaging of cytoskeletal dynamics in Xenopus oocytes and eggs. Differentiation 71, 518–527.

Betley, JN, Frith, MC, Graber, JH, Choo, S, and Deshler, JO (2002). A Ubiquitous and Conserved Signal for RNA Localization in Chordates. Curr Biol 12, 1756–1761.

Birsoy, B, Kofron, M, Schaible, K, Wylie, C, and Heasman, J (2006). Vg1 is an essential signaling molecule in Xenopus development. Development 133, 15–20.

\*Blum, M, and Ott, T (2018). Xenopus: An undervalued model organism to study and model human genetic disease. Cells Tissues Organs 205, 303–312.

Boke, E, Ruer, M, Wühr, M, Coughlin, M, Lemaitre, R, Gygi, SP, Alberti, S, Drechsel, D, Hyman, AA, and Mitchison, TJ (2016). Amyloid-like Self-Assembly of a Cellular Compartment. Cell 166, 637–650.

Bontems, F, Stein, A, Marlow, F, Lyautey, J, Gupta, T, Mullins, MC, and Dosch, R (2009). Bucky Ball Organizes Germ Plasm Assembly in Zebrafish. Curr Biol 19, 414–422.

Bubunencko, M, Kress, TL, Vempati, UD, Mowry, KL, and King, M Lou (2002). A consensus RNA signal that directs germ layer determinants to the vegetal cortex of Xenopus oocytes. Dev Biol 248, 82–92.

Carotenuto, R, Petrucci, TC, Correias, I, Vaccaro, MC, De Marco, N, Dale, B, and Wilding, M (2009).

Protein 4.1 and its interaction with other cytoskeletal proteins in *Xenopus laevis* oogenesis. *Eur J Cell Biol* 88, 343–356.

Castillon, GA, Adames, NR, Rosello, CH, Seidel, HS, Longtine, MS, Cooper, JA, and Heil-Chapdelaine, RA (2003). Live Imaging of Endogenous RNA Reveals a Diffusion and Entrapment Mechanism for nanos mRNA Localization in *Drosophila*. *Curr Biol* 13, 654–658.

Cha, SW, McAdams, M, Kormish, J, Wylie, C, and Kofron, M (2012). Foxi2 is an animally localized maternal mRNA in *xenopus*, and an activator of the zygotic ectoderm activator foxi1e. *PLoS One* 7, 1–10.

Chan, AP, Kloc, M, and Etkin, LD (1999). fatvg encodes a new localized RNA that uses a 25-nucleotide element (FVLE1) to localize to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes. *Development* 126, 4943–4953.

Chang, P, Giddings, TH, Winey, M, and Stearns, T (2003). E-tubulin is required for centriole duplication and microtubule organization. *Nat Cell Biol* 5, 71–76.

Chang, P, Torres, J, Lewis, RA, Mowry, KL, Houliston, E, and King, M Lou (2004). Localization of RNAs to the mitochondrial cloud in *Xenopus* oocytes through entrapment and association with endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 15, 4669–4681.

Charlesworth, A, Cox, LL, and MacNicol, AM (2004). Cytoplasmic Polyadenylation Element (CPE)- and CPE-binding Protein (CPEB)-independent Mechanisms Regulate Early Class Maternal mRNA Translational Activation in *Xenopus* Oocytes. *J Biol Chem* 279, 17650–17659.

Cheikh, A, Tabka, H, Tlili, Y, Santulli, A, Bouzouaya, N, Bouhaouala-Zahar, B, and Benkhalifa, R (2019). *Xenopus* oocyte's conductance for bioactive compounds screening and characterization. *Int J Mol Sci* 20, 1–13.

Choo, S, Heinrich, B, Betley, JN, Chen, Z, and Deshler, JO (2005). Evidence for common machinery utilized by the early and late RNA localization pathways in *Xenopus* oocytes. *Dev Biol* 278, 103–117.

Claußen, M, and Pieler, T (2010). Identification of vegetal RNA-localization elements in *Xenopus* oocytes. *Methods* 51, 146–151.

Cote, CA, Gautreau, D, Denegre, JM, Kress, TL, Terry, NA, and Mowry, KL (1999). A *Xenopus* protein related to hnRNP I has a role in cytoplasmic RNA localization. *Mol Cell* 4, 431–437.

Cragle, CE, MacNicol, MC, Byrum, SD, Hardy, LL, Mackintosh, SG, Richardson, WA, Gray, NK, Childs, G V., Tackett, AJ, and MacNicol, AM (2019). Musashi interaction with poly(A)-binding protein is required for activation of target mRNA translation. *J Biol Chem* 294, 10969–10986.

Cuykendall, TN, and Houston, DW (2009). Vegetally localized *Xenopus* trim36 regulates cortical rotation and dorsal axis formation. *Development* 136, 3057–3065.

Cuykendall, TN, and Houston, DW (2010). Identification of Germ Plasm-Associated Transcripts by Microarray Analysis of *Xenopus* Vegetal Cortex RNA. *Dev Dyn* 239, 1838–1848.

Dale, L, and Slack, JMW (1987). Fate map for the 32-cell stage of *Xenopus laevis*. *Development* 99, 527–551.

Danilchik, M V., and Gerhart, JC (1987). Differentiation of the animal-vegetal axis in *Xenopus laevis* oocytes. I. Polarized intracellular translocation of platelets establishes the yolk gradient. *Dev Biol* 122, 101–112.

De Domenico, E, Owens, NDL, Grant, IM, Gomes-Faria, R, and Gilchrist, MJ (2015). Molecular asymmetry in the 8-cell stage *Xenopus tropicalis* embryo described by single blastomere transcript sequencing. *Dev Biol* 408, 252–268.

Dumont, JN (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* 136, 153–179.

Elinson, RP, King, M Lou, and Forristall, C (1993). Isolated vegetal cortex from *Xenopus* oocytes selectively retains localized mRNAs. *Dev Biol* 160, 554–562.

Elinson, RP, and Rowning, B (1988). A transient array of parallel microtubules in frog eggs: Potential tracks for a cytoplasmic rotation that specifies the dorso-ventral axis. *Dev Biol* 128, 185–197.

Field, CM, Pelletier, JF, and Mitchison, TJ (2017). *Xenopus* extract approaches to studying microtubule organization and signaling in cytokinesis. *Methods Cell Biol* 137, 395–435.

Flachsova, M, Sindelka, R, and Kubista, M (2013). Single blastomere expression profiling of *Xenopus laevis* embryos of 8 to 32-cells reveals developmental asymmetry. *Sci Rep* 3, 1–6.

Forristall, C, Pondel, M, Chen, L, and King, ML (1995). Patterns of localization and cytoskeletal association of two vegetally localized RNAs, Vg1 and Xcat-2. *Development* 121, 201–208.

Franz, JK, Gall, L, Williams, MA, Picheral, B, and Franke, WW (1983). Intermediate-size filaments in a germ cell: Expression of cytokeratins in oocytes and eggs of the frog *Xenopus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 6254–6258.

Gagnon, JA, Kreiling, JA, Powrie, EA, Wood, TR, and Mowry, KL (2013). Directional Transport Is Mediated by a Dynein-Dependent Step in an RNA Localization Pathway. *PLoS Biol* 11, 1–11.

Gard, DL (1999). Confocal microscopy and 3-D reconstruction of the cytoskeleton of *Xenopus* oocytes. *Microsc Res Tech* 44, 388–414.

Gard, DL, Cha, BJ, and King, E (1997). The Organization and Animal–Vegetal Asymmetry of Cytokeratin Filaments in Stage VI *Xenopus* Oocytes Is Dependent upon F-Actin and Microtubules. *Dev Biol* 184, 95–114.

Goldberg, M, Jenkins, H, Allen, T, Whitfield, WGF, and Hutchison, CJ (1995). Xenopus lamin B3 has a direct role in the assembly of a replication competent nucleus: Evidence from cell-free egg extracts. *J Cell Sci* 108, 3451–3461.

Grant, PA, Yan, B, Johnson, MA, Johnson, DLE, and Moody, SA (2014). Novel animal pole-enriched maternal mRNAs are preferentially expressed in neural ectoderm. *Dev Dyn* 243, 478–496.

\*Hardwick, LJA, and Philpott, A (2015). An oncologist's friend: How Xenopus contributes to cancer research. *Dev Biol* 408, 180–187.

Hayes, MH, and Weeks, DL (2016). Amyloids assemble as part of recognizable structures during oogenesis in Xenopus. *Biol Open* 5, 801–806.

Heasman, J, Quarmby, J, and Wylie, CC (1984). The mitochondrial cloud of Xenopus oocytes: The source of germinal granule material. *Dev Biol* 105, 458–469.

Heinrich, B, and Deshler, JO (2009). RNA localization to the Balbiani body in Xenopus oocytes is regulated by the energy state of the cell and is facilitated by kinesin II. *Rna* 15, 524–536.

Horvay, K, Claußen, M, Katzer, M, Landgrebe, J, and Pieler, T (2006). Xenopus Dead end mRNA is a localized maternal determinant that serves a conserved function in germ cell development. *Dev Biol* 291, 1–11.

Hwang, H, Jin, Z, Krishnamurthy, VV, Saha, A, Klein, PS, Garcia, B, Mei, W, King, M Lou, Zhang, K, and Yang, J (2019). Novel functions of the ubiquitin-independent proteasome system in regulating Xenopus germline development. *Dev* 146, 1–12.

Keiper, BD, and Rhoads, RE (1997). Cap-independent translation initiation in Xenopus oocytes. *Nucleic Acids Res* 25, 395–402.

Kloc, M, Bilinski, S, and Dougherty, MT (2007). Organization of cytokeleton and germ plasm in the vegetal cortex of Xenopus laevis oocytes depends on coding and non-coding RNAs: Three-dimensional and ultrastructural analysis. *Exp Cell Res* 313, 1639–1651.

\*Kloc, M, Bilinski, S, and Etkin, LD (2004). The Balbiani Body and Germ Cell Determinants: 150 Years Later. *Curr Top Dev Biol* 59, 1–36.

Kloc, M, Dougherty, MT, Bilinski, S, Chan, AP, Brey, E, King, M Lou, Patrick, CW, and Etkin, LD (2002). Three-dimensional ultrastructural analysis of RNA distribution within germinal granules of Xenopus. *Dev Biol* 241, 79–93.

Kloc, M, and Etkin, LD (1994). Delocalization of Vg1 mRNA from the vegetal cortex in Xenopus oocytes after destruction of Xlirt RNA. *Science* (80- ) 265, 1101–1103.

Kloc, M, and Etkin, LD (1995). Two distinct pathways for the localization of RNAs at the vegetal cortex

in *Xenopus* oocytes. *Development* 121, 287–297.

Kloc, M, and Etkin, LD (1998). Apparent continuity between the messenger transport organizer and late RNA localization pathways during oogenesis in *Xenopus*. *Mech Dev* 73, 95–106.

Kloc, M, Larabell, C, and Etkin, LD (1996). Elaboration of the messenger transport organizer pathway for localization of RNA to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes. *Dev Biol* 180, 119–130.

Kloc, M, Wilk, K, Vargas, D, Shirato, Y, Bilinski, S, and Etkin, LD (2005). Potential structural role of non-coding and coding RNAs in the organization of the cytoskeleton at the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes. *Development* 132, 3445–3457.

Klymkowsky, MW, Maynell, LA, and Polson, AG (1987). Polar asymmetry in the organization of the cortical cytokeratin system of *Xenopus laevis* oocytes and embryos. *Development* 100, 543–557.

Kress, TL, Yoon, YJ, and Mowry, KL (2004). Nuclear RNP complex assembly initiates cytoplasmic RNA localization. *J Cell Biol* 165, 203–211.

Krishnakumar, P, Riemer, S, Perera, R, Lingner, T, Goloborodko, A, Khalifa, H, Bontems, F, Kaufholz, F, El-Brolosy, MA, and Dosch, R (2018). Functional equivalence of germ plasm organizers. *PLoS Genet* 14, 1–29.

Kroll, TT, Swenson, LB, Hartland, EI, Snedden, DD, Goodson, H V., and Huber, PW (2009). Interactions of 40LoVe within the ribonucleoprotein complex that forms on the localization element of *Xenopus* Vg1 mRNA. *Mech Dev* 126, 523–538.

Kwon, S, Abramson, T, Munro, TP, John, CM, Köhrmann, M, and Schnapp, BJ (2002). UUCAC- and Vera-dependent localization of VegT RNA in *Xenopus* oocytes. *Curr Biol* 12, 558–564.

Lai, F, Zhou, Y, Luo, X, Fox, J, and King, M Lou (2011). Nanos1 functions as a translational repressor in the *Xenopus* germline. *Mech Dev* 128, 153–163.

Levin, M, Thorlin, T, Robinson, KR, Nogi, T, and Mercola, M (2002). Asymmetries in H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and cell membrane potentials comprise a very early step in left-right patterning. *Cell* 111, 77–89.

Lewis, RA, Gagnon, JA, and Mowry, KL (2008). PTB/hnRNP I Is Required for RNP Remodeling during RNA Localization in *Xenopus* Oocytes. *Mol Cell Biol* 28, 678–686.

\*Lewis, RA, and Mowry, KL (2007). Ribonucleoprotein remodeling during RNA localization. *Differentiation* 75, 507–518.

Luo, X, Nerlick, S, An, W, and King, M Lou (2011). *Xenopus* germline nanos1 is translationally repressed by a novel structure-based mechanism. *Development* 138, 589–598.

Machado, RJ, Moore, W, Hames, R, Houlston, E, Chang, P, King, M Lou, and Woodland, HR (2005). *Xenopus* Xpat protein is a major component of germ plasm and may function in its organisation and

positioning. *Dev Biol* 287, 289–300.

Marchant, JS (2018). Heterologous protein expression in the xenopus oocyte. *Cold Spring Harb Protoc* 2018, 253–257.

Messitt, TJ, Gagnon, JA, Kreiling, JA, Pratt, CA, Yoon, YJ, and Mowry, KL (2008). Multiple Kinesin Motors Coordinate Cytoplasmic RNA Transport on a Subpopulation of Microtubules in *Xenopus* Oocytes. *Dev Cell* 15, 426–436.

Meyer, KD, Patil, DP, Zhou, J, Zinoviev, A, Skabkin, MA, Elemento, O, Pestova, T V., Qian, SB, and Jaffrey, SR (2015). 5' UTR m6A Promotes Cap-Independent Translation. *Cell* 163, 999–1010.

Mortensen, RD, Serra, M, Steitz, JA, and Vasudevan, S (2011). Posttranscriptional activation of gene expression in *Xenopus laevis* oocytes by microRNA-protein complexes (microRNPs). *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 8281–8286.

Mowry, KL (2020). Using the *Xenopus* Oocyte Toolbox. *Cold Spring Harb Protoc* 1, 1–5.

Murchison, EP, Stein, P, Xuan, Z, Pan, H, Zhang, MQ, Schultz, RM, and Hannon, GJ (2007). Critical roles for Dicer in the female germline. *Genes Dev* 21, 682–693.

Nakahata, S, Kotani, T, Mita, K, Kawasaki, T, Katsu, Y, Nagahama, Y, and Yamashita, M (2003). Involvement of *Xenopus* Pumilio in the translational regulation that is specific to cyclin B1 mRNA during oocyte maturation. *Mech Dev* 120, 865–880.

Nieuwkoop, PD (1969). The Formation of the Mesoderm in Urodelean Amphibians - II. The origin of the dorso-ventral polarity of the mesoderm. *Wilhelm Roux Arch Für Entwicklungsmechanik Der Org* 163, 298–315.

Nijjar, S, and Woodland, HR (2013a). Localisation of RNAs into the Germ Plasm of Vitellogenic *Xenopus* Oocytes. *PLoS One* 8, 1–19.

Nijjar, S, and Woodland, HR (2013b). Protein interactions in *Xenopus* germ plasm RNP particles. *PLoS One* 8, 1–18.

Nishizawa, M, Furuno, N, Okazaki, K, Tanaka, H, Ogawa, Y, and Sagata, N (1993). Degradation of Mos by the N-terminal proline (Pro2)-dependent ubiquitin pathway on fertilization of *Xenopus* eggs: possible significance of natural selection for Pro2 in Mos. *EMBO J* 12, 4021–4027.

Olson, DJ, Oh, D, and Houston, DW (2015). The dynamics of plus end polarization and microtubule assembly during *Xenopus* cortical rotation. *Dev Biol* 401, 249–263.

Onjiko, RM, Moody, SA, and Nemes, P (2015). Single-cell mass spectrometry reveals small molecules that affect cell fates in the 16-cell embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 6545–6550.

Ota, R, Kotani, T, and Yamashita, M (2011). Biochemical characterization of pumilio1 and pumilio2 in

Xenopus oocytes. J Biol Chem 286, 2853–2863.

Palecek, J, Habrova, V, Nedvidek, J, and Romanovsky, A (1985). Dynamics of tubulin structures in Xenopus laevis oogenesis. J Embryol Exp Morphol 87, 75–86.

Pepling, ME, Wilhelm, JE, O’Hara, AL, Gephardt, GW, and Spradling, AC (2007). Mouse oocytes within germ cell cysts and primordial follicles contain a Balbiani body. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 187–192.

Pocherniaieva, K, Sidova, M, Havelka, M, Saito, T, Psenicka, M, Sindelka, R, and Kaspar, V (2018). Comparison of oocyte mRNA localization patterns in sterlet Acipenser ruthenus and African clawed frog Xenopus laevis. J Exp Zool Part B Mol Dev Evol 330, 181–187.

Qi, ST, Ma, JY, Wang, ZB, Guo, L, Hou, Y, and Sun, QY (2016). N6 -methyladenosine sequencing highlights the involvement of mRNA methylation in oocyte meiotic maturation and embryo development by regulating translation in xenopus laevis. J Biol Chem 291, 23020–23026.

\*Radford, HE, Meijer, HA, and de Moor, CH (2008). Translational control by cytoplasmic polyadenylation in Xenopus oocytes. Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech 1779, 217–229.

Rocha, W et al. (2007). Switching from Repression to Activation: MicroRNAs Can Up-Regulate Translation. Science 318, 1931–1934.

Roeder, AD, and Gard, DL (1994). Confocal microscopy of f-actin distribution in xenopus oocytes. Zygote 2, 111–124.

Rutledge, CE, Lau, HT, Mangan, H, Hardy, LL, Sunnotel, O, Guo, F, MacNicol, AM, Walsh, CP, and Lees-Murdock, DJ (2014). Efficient translation of Dnmt1 requires cytoplasmic polyadenylation and musashi binding elements. PLoS One 9, 1–11.

Ryabova, L V., Betina, MI, and Vassetzky, SG (1986). Influence of cytochalasin B on oocyte maturation in Xenopus laevis. Cell Differ 19, 89–96.

\*Sato, K ichi, and Tokmakov, AA (2020). Toward the understanding of biology of oocyte life cycle in Xenopus Laevis: No oocytes left behind. Reprod Med Biol, 1–6.

Schroeder, KE, Condic, ML, Eisenberg, LM, and Yost, HJ (1999). Spatially regulated translation in embryos: Asymmetric expression of maternal Wnt-11 along the dorsal-ventral axis in Xenopus. Dev Biol 214, 288–297.

Session, AM et al. (2016). Genome evolution in the allotetraploid frog Xenopus laevis. Nature 538, 336–343.

Setoyama, D, Yamashita, M, and Sagata, N (2007). Mechanism of degradation of CPEB during Xenopus oocyte maturation. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 18001–18006.

Shah, V V., Soibam, B, Ritter, RA, Benham, A, Oomen, J, and Sater, AK (2017). MicroRNAs and

ectodermal specification I. Identification of miRs and miR-targeted mRNAs in early anterior neural and epidermal ectoderm. *Dev Biol* 426, 200–210.

Sidova, M, Sindelka, R, Castoldi, M, Benes, V, and Kubista, M (2015). Intracellular microRNA profiles form in the *Xenopus laevis* oocyte that may contribute to asymmetric cell division. *Sci Rep* 5, 1–9.

Sindelka, R et al. (2018). Asymmetric distribution of biomolecules of maternal origin in the *Xenopus laevis* egg and their impact on the developmental plan. *Sci Rep* 8, 1–16.

Sindelka, R, Jonák, J, Hands, R, Bustin, SA, and Kubista, M (2008). Intracellular expression profiles measured by real-time PCR tomography in the *Xenopus laevis* oocyte. *Nucleic Acids Res* 36, 387–392.

Sindelka, R, Sidova, M, Svec, D, and Kubista, M (2010). Spatial expression profiles in the *Xenopus laevis* oocytes measured with qPCR tomography. *Methods* 51, 87–91.

Skirkanich, J, Luxardi, G, Yang, J, Kodjabachian, L, and Klein, PS (2011). An essential role for transcription before the MBT in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 357, 478–491.

Smits, AH, Lindeboom, RG, Perino, M, Van Heeringen, SJ, Veenstra, GJC, and Vermeulen, M (2014). Global absolute quantification reveals tight regulation of protein expression in single *Xenopus* eggs. *Nucleic Acids Res* 42, 9880–9891.

Snedden, DD, Bertke, MM, Vernon, D, and Huber, PW (2013). RNA localization in *Xenopus* oocytes uses a core group of trans-acting factors irrespective of destination. *Rna* 19, 889–895.

Sudou, N, Garcés-Vásquez, A, López-Latorre, MA, Taira, M, and Del Pino, EM (2016). Transcription factors Mix1 and VegT, relocalization of vegt mRNA, and conserved endoderm and dorsal specification in frogs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 5628–5633.

Sun, L, Bertke, MM, Champion, MM, Zhu, G, Huber, PW, and Dovichi, NJ (2014). Quantitative proteomics of *Xenopus laevis* embryos: expression kinetics of nearly 4000 proteins during early development. *Sci Rep* 4365, 1–9.

Tada, H, Mochii, M, Orii, H, and Watanabe, K (2012). Ectopic formation of primordial germ cells by transplantation of the germ plasm: Direct evidence for germ cell determinant in *Xenopus*. *Dev Biol* 371, 86–93.

Takahashi, K, Ishii, K, and Yamashita, M (2018). Stauf1, Kinesin1 and microtubule function in cyclin B1 mRNA transport to the animal polar cytoplasm of zebrafish oocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 503, 2778–2783.

Tao, Q, Yokota, C, Puck, H, Kofron, M, Birsoy, B, Yan, D, Asashima, M, Wylie, CC, Lin, X, and Heasman, J (2005). Maternal Wnt11 activates the canonical Wnt signaling pathway required for axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 120, 857–871.



Terasaki, M, Runft, LL, and Hand, AR (2001). Changes in organization of the endoplasmic reticulum during *Xenopus* oocyte maturation and activation. *Mol Biol Cell* 12, 1103–1116.

Thomsen, GH, and Melton, DA (1993). Processed Vg1 protein is an axial mesoderm inducer in *xenopus*. *Cell* 74, 433–441.

Vaccaro, MC, Wilding, M, Dale, B, Campanella, C, and Carotenuto, R (2012). Expression of XNOA 36 in the mitochondrial cloud of *Xenopus laevis* oocytes. *Zygote* 20, 237–242.

Varnum, SM, and Wormington, MW (1990). Deadenylation of maternal mRNAs during *Xenopus* oocyte maturation does not require specific cis-sequences: A default mechanism for translational control. *Genes Dev* 4, 2278–2286.

Vincent, JP, and Gerhart, JC (1987). Subcortical rotation in *Xenopus* eggs: An early step in embryonic axis specification. *Dev Biol* 123, 526–539.

Watanabe, T, Takeda, A, Mise, K, Okuno, T, Suzuki, T, Minami, N, and Imai, H (2005). Stage-specific expression of microRNAs during *Xenopus* development. *FEBS Lett* 579, 318–324.

Wilczynska, A, Git, A, Argasinska, J, Belloc, E, and Standart, N (2016). CPEB and miR-15/16 Co-Regulate Translation of Cyclin E1 mRNA during *Xenopus* Oocyte Maturation. *PLoS One* 11, 1–21.

Wilk, K, Bilinski, S, Dougherty, MT, and Kloc, M (2005). Delivery of germinal granules and localized RNAs via the messenger transport organizer pathway to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes occurs through directional expansion of the mitochondrial cloud. *Int J Dev Biol* 49, 17–21.

Wood, TA, Mowry, KL, Powrie, EA, O’Connell, LC, Cabral, SE, Jeschonek, SP, and Neil, CR (2020). L-bodies are novel RNA-protein condensates driving RNA transport in *Xenopus* oocytes. *Dev Cell* 54, 1–56.

Xanthos, JB, Kofron, M, Wylie, C, and Heasman, J (2001). Maternal VegT is the initiator of a molecular network specifying endoderm in *Xenopus laevis*. *Development* 128, 167–180.

Xie, J, Lee, JA, Kress, TL, Mowry, KL, and Black, DL (2003). Protein kinase A phosphorylation modulates transport of the polypyrimidine tract-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8776–8781.

Yamagishi, Y, and Abe, H (2015). Reorganization of actin filaments by ADF/cofilin is involved in formation of microtubule structures during *Xenopus* oocyte maturation. *Mol Biol Cell* 26, 4387–4400.

Yamaguchi, T, Taguchi, A, Watanabe, K, and Oritani, H (2012). DEADSouth protein localizes to germ plasm and is required for the development of primordial germ cells in *Xenopus laevis*. *Biol Open* 2, 191–199.

Yang, F, Wang, W, Cetinbas, M, Sadreyev, R, and Blower, M (2020). Genome-wide analysis identifies cis-acting elements regulating mRNA polyadenylation and translation during vertebrate oocyte maturation. *Rna* 26, 1–59.

- Yisraeli, JK, Sokol, S, and Melton, DA (1990). A two-step model for the localization of maternal mRNA in *Xenopus* oocytes: involvement of microtubules and microfilaments in the translocation and anchoring of Vg1 mRNA. *Development* 108, 289–298.
- Yoon, YJ, and Mowry, KL (2004). *Xenopus* Staufien is a component of a ribonucleoprotein complex containing Vg1 RNA and kinesin. *Development* 131, 3035–3045.
- Zearfoss, NR, Chan, AP, Wu, CF, Kloc, M, and Etkin, LD (2004). Hermes is a localized factor regulating cleavage of vegetal blastomeres in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 267, 60–71.
- Zelazowska, M, Kilarski, W, Bilinski, SM, Podder, DD, and Kloc, M (2007). Balbiani cytoplasm in oocytes of a primitive fish, the sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii*, and its potential homology to the Balbiani body (mitochondrial cloud) of *Xenopus laevis* oocytes. *Cell Tissue Res* 329, 137–145.
- Zeng, SL, Sudlow, LC, and Berezin, MY (2020). Using *Xenopus* oocytes in neurological disease drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 15, 39–52.
- Zhang, J, and King, M Lou (1996). *Xenopus* VegTRNA is localized to the vegetal cortex during oogenesis and encodes a novel T-box transcription factor involved in mesodermal patterning. *Development* 122, 4119–4129.
- Zhang, Y, Forinash, KD, McGivern, J, Fritz, B, Dorey, K, and Sheets, MD (2009). Spatially Restricted Translation of the xCR1 mRNA in *Xenopus* Embryos. *Mol Cell Biol* 29, 3791–3802.
- Zhao, W, Jiang, C, Kroll, TT, and Huber, PW (2001). A proline-rich protein binds to the localization element of *Xenopus* Vg1 mRNA and to ligands involved in actin polymerization. *EMBO J* 20, 2315–2325.
- Zhou, Y, and King, M Lou (1996a). Localization of Xcat-2 RNA, a putative germ plasm component, to the mitochondrial cloud in *Xenopus* stage I oocytes. *Development* 122, 2947–2953.
- Zhou, Y, and King, M Lou (1996b). RNA transport to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes. *Dev Biol* 179, 173–183.